TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR KARKASLARINDA *Staphylococcus aureus*'un VARLIĞI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Erhan KEYVAN

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. Haydar ÖZDEMİR

2014-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR KARKASLARINDA *Staphylococcus aureus*'un VARLIĞI, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Erhan KEYVAN

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

PROF. DR. Haydar ÖZDEMİR

2014-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 04.06.2014

Prof. Dr. Belgin SARIMEHMETOĞLU
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Gülderen YENTUR
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. T. Haluk ÇELİK
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

Prof. Dr. Haydar ÖZDEMİR
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

Doç. Dr. Barış SARIEYYUPOĞLU
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	3
1.2. *S. aureus*'un Klasifikasyonu ve Genel Özellikleri	3
1.3. *S. aures*'un Üremesi ve Toksin Oluşturması İçin Gerekli Faktörler	5
1.3.1. Sıcaklık	6
1.3.2. Tuz ve Diğer Kimyasallar	6
1.3.3. pH, Su Aktivitesi (aw) ve Diğer Parametreler	6
1.4. *S. aureus* Ekzoproteinleri	7
1.4.1. Pireojenik Toksin Süperantijenleri (PTSAg'ler)	7
1.4.2. Stafilokokal Enterotoksinler	8
1.4.2.1. Stafilokokal Enterotoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	9
1.4.2.2. Stafilokokal Enterotoksinlerin Genetik Özellikleri	11
1.4.2.3. Enterotoksinlerin Süperantijen Aktiviteleri	11
1.4.2.4. Stafilokokal Enterotoksinler	11
1.4.2.4.1. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA)	11
1.4.2.4.2. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB)	12
1.4.2.4.3. Stafilokokal Enterotoksin C (SEC)	12
1.4.2.4.4. Stafilokokal Enterotoksin D (SED)	12
1.4.2.4.5. Stafilokokal Enterotoksin E (SEE)	13
1.4.2.4.6. Stafilokokal Enterotoksin G (SEG)	13
1.4.2.4.7. Stafilokokal Enterotoksin H (SEH)	13
1.4.2.4.8. Stafilokokal Enterotoksin I (SEI)	13
1.4.2.4.9. Stafilokokal Enterotoksin J (SEJ)	14
1.4.2.5. Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)	14
1.4.3. Eksfoliyatif Toksin	14
1.4.4. Hemolizin ve Lökosidin'in Yapısal Biyolojisi	15
1.4.4.1. Alfa Hemolizin (Alfa Toksin)	15
1.4.4.2. Beta Hemolizin (Sfingomyelinaz C)	16
1.4.4.3. Gamma Hemolizin ve PV- Lökosidin (İki Komponent Toksin)	16
1.4.4.4. Delta Hemolizin (Delta Toksin)	17
1.5. *S. aureus* Antibiyotik Direnci ve Mekanizması	17
1.5.1. Beta-Laktam Direnci	18
1.5.1.1. Penisilin Direnci	18

1.5.1.2. Metisilin Direnci 19
1.5.2. Glikopeptid Direnci 20
1.5.3. Aminoglikozid Direnci 21
1.5.4. Tetrasiklin Direnci 21
1.5.5. Kinolon Direnci 22
1.6. Stafilokokal Gıda Zehirlenmelerinde Patogenez ve Semptomlar 22
1.7. *S. aureus*'un Gıdalarda Varlığı 24
1.7.1. Et ve Et Ürünlerinde *S. aureus* Varlığı 25
1.7.2. Süt ve Süt Ürünlerinde *S. aureus* Varlığı 25
1.7.3. Diğer Gıdalarda *S. aureus* Varlığı 26
1.8. Sığır Karkaslarında Örnek Alma Yöntemleri 26
1.9. Epidemiyoloji 27
1.10. Gıdalarda MRSA Varlığı ve Potansiyel Riskler 31
1.111. Korunma ve Kontrol 34
… …
2. GEREÇ VE YÖNTEM 36
2.1. GEREÇ 36
2.1.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Test Malzemeleri 36
2.1.2. PCR Analizlerinde Kullanılan Malzemeler 38
2.1.3. DNA İzolasyonu Amacıyla Kullanılan Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit 41
2.1.4. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri 41
2.2. YÖNTEM 43
2.2.1. Örneklerin Alınması 43
2.2.2. Mikrobiyolojik Analizler 43
2.2.2.1. Mikrokok/Stafilokokların Saptanması 44
2.2.2.2. *S. aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu 44
2.2.2.3. Koagulaz Testi 44
2.2.2.3. DNase Testi 45
2.2.2.4. Anaerobik Mannitol Fermentasyon Testi 46
2.2.2.5. β- Hemoliz Testi 47
2.2.2.6. Staphylase Testi 47
2.2.3. *S. aureus* İzolatlarının PCR Tekniği İle Doğrulanması 48
2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu 48
2.2.3.2. *nuc* ve *16S rRNA* Geninin Multiplex PCR Yöntemi ile Tespiti 49
2.2.3.2.1. Gradient PCR 49
2.2.3.2.2. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 50
2.2.3.2.3. Agaroz Jel Elekteroforez 51
2.2.3.3. *mecA* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti 51
2.2.3.3.1. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 51
2.2.3.3.2. Agaroz Jel Elekteroforez 52
2.2.3.4. Toksin Oluşturan Genlerin Multiplex PCR Yöntemi ile Tespiti 52
2.2.3.4.1. Set A PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 53
2.2.3.4.2. Set B PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 53
2.2.3.4.3. Set C PCR Protokolü ve Amplifikasyonu 54
2.2.3.4.4. *tst* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti 54
2.2.3.4.5. Agaroz Jel Elekteroforez 55
2.2.4. Antibiyotik Direncinin Tespiti 55

2.2.5. Referans suşlar 56
… …
3. BULGULAR 57
3.1. Sığır Karkaslarında Koagulaz Pozitif Stafilokoklar ve *S. aureus*'un Varlığı 57
3.2. PCR Sonuçları 58
3.3. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları 62
… …
4. TARTIŞMA 63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 70
ÖZET 71
SUMMARY 72
KAYNAKLAR 73
ÖZGEÇMİŞ 84

ÖNSÖZ

Hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında temel gıda maddelerinden olan kırmızı et, insanların sağlıklı beslenmesinde vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Hijyenik koşullarda üretilmeyen et ve et ürünleri ise insanlarda çeşitli sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar tüm dünyada önemli olmakla birlikte bazı olgularda ölümle sonuçlanan vakalar meydana gelebilir. Bu amaçla hayvanların beslenmesi, hijyenik koşullarda kesilmesi ve et ürünlerinin tüketiciye ulaştırılması aşamalarında gıda güvenliği kurallarının eksiksiz uygulanması gerekmektedir.

Staphylococcus aureus, birçok ülkede önemli gıda zehirlenmelerine neden olan bir patojendir. Gıdalara uygulanan ısı işlemine bağlı olarak inaktive olmasına rağmen, özellikle sindirim sistemi üzerine etkili ve ısıya dirençli toksinlerinin gıdalarla birlikte alınması stafilokokal intoksikasyonlara neden olmaktadır. Bu intoksikasyonlar, hem halk sağlığı sorunlarına hem de önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır.

Bu tez çalışması, sığır karkaslarında *S. aureus* varlığının belirlenmesi, enterotoksijenik özelliklerinin saptanması ve antibiyotik dirençliliklerinin tespit edilmesi amacıyla planlanmıştır.

Tez çalışma konusunun seçilmesi ve yürütülmesi aşamasında göstermiş olduğu ilgi ve katkılarından dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Haydar ÖZDEMİR başta olmak üzere, bölüm başkanımız, bölüm hocalarım ve asistan arkadaşlarıma, Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL ve Yrd. Doç Dr. Bengi ÇINAR KUL hocalarıma, değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Güzin İPLİKÇİOĞLU ÇİL ve Arş. Gör. Nüket BİLGEN'e, beni bugünlere getiren aileme, hayatımın her anında bana destek veren değerli eşim Nilay KEYVAN ve ailesine, hayat enerjim biricik kızım Yağmur Eda'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
agr	Accessory gene regulator
APC	Antigen Presenting Cell
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	Su aktivitesi değeri
C	Karbon
Ca^{+2}	Kalsiyum
CA-MRSA	Community Associated- Methicilin Resistant *S. aureus*
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
E_h	Redoks Potansiyeli
FAO	Food and Agriculture Organization
FSIS	Food Safety and Inspection Service
GMP	Good Manufacturing Practice
INCSS	International Nomenclature Committee for Staphylococcal SAgs
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
ISO	International Organization for Standardization
K^+	Potasyum
Kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
kob	Koloni oluşturan birim
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRSA	Methicilin Resistant *S. aureus*- Metisiline dirençli *S. aureus*
MSSA	Methicilin Sensitive *S. aureus*- Metisiline duyarlı*S. aureus*
N	Azot
Na^{+2}	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NH_2	Amin
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PTSAgs	Pireojenik Toksin Süperantijenleri
PVL	Panton-Valentine-Leukocidin
SaPI	Superantigen Pathogenicity Island
Sar	Staphylococcal accesory gen regulator
SCC*mec*	Staphylococcal Casette Chromosome *mec*
SE	Stafilokokal Enterotoksin
SEl	Staphylococcal Enterotoxin like

sn	Saniye
SPE	Streptokokkal Pirojenik Ekzotoksinler
SSA	Streptococcal Superantigen A
SSSS	Staphylococal Scalded Skin Syndrome
TCR	T Cell Reseptor
TNase	Thermonuclease
TSST	Toksik Şok Sendrom Toksin
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
USDA	U.S. Department of Agriculture
VISA	Vancomycin Intermediate-Resistant *S. aureus*
VRSA	Vancomycin Resistant *S. aureus*
Zn^{+2}	Çinko
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Koagulaz pozitif izolatlar 45
Şekil 2.2. DNase pozitif izolatlar 46
Şekil 2.3. Mannitol pozitif izolatlar 47
Şekil 2.4. β-Hemoliz izolatlar 48
Şekil 2.5. DNA ekstraksiyon görüntüsü 49
Şekil 2.6. Gradient PCR görüntüsü 50
Şekil 2.7. Antibiyotik direnci için yapılan disk difüzyon testi görüntüsü 56
Şekil 3.1. *nuc, 16S rRNA* genlerine göre *S. aureus* olarak doğrulanan izolatların multipleks PCR görüntüsü 58
Şekil 3.2. *seb, see, seh, sei* enterotoksin genleri multipleks PCR görüntüsü 60
Şekil 3.3. *sea, seg* enterotoksin genleri multipleks PCR görüntüsü 60
Şekil 3.4. *sej, sed, sec* enterotoksin genleri multipleks PCR görüntüsü 61
Şekil 3.5. *tst* geni PCR görüntüsü 61

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Bazı Stafilokok türlerinin genel özellikleri 5

Çizelge 1.2. *S. aureus*'un üremesi ve toksin üretimi için gerekli koşullar 7

Çizelge 1.3. Stafilokokal enterotoksinlerin bazı özellikleri 10

Çizelge 1.4. CDC tarafından rapor edilen 573 stafilokokal gıda zehirlenmesi salgını 28

Çizelge 1.5. Rapor edilen MRSA olguları 34

Çizelge 2.1. Primerler 39

Çizelge 2.1. Devam. Primerler 40

Çizelge 2.2. Antibiyotik diskleri 42

Çizelge 2.3. PCR Setleri 53

Çizelge 3.1. Sığır karkas örneklerinde koagulaz pozitif *S. aureus*'un bulunuşu 57

Çizelge 3.2. *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik özellikleri 59

Çizelge 3.3. *S. aureus* izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı dirençliliği 62

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla büyümesine bağlı olarak gıda ihtiyacı da artmaktadır. Bu ihtiyaca bağlı olarak gıdaların kaliteli bir şekilde temin edilmesinde de problemler ortaya çıkmaktadır. Ayrıca gıda üretiminin çeşitli aşamalarında gerekli hijyenik önlemlerin alınmaması sebebiyle gıdalar farklı tipte patojenler ile kontamine olarak, halk sağlığı açısından da riskler oluşturmuştur. Özellikle hijyenik şartların uygun olmadığı koşullarda kesilen sığır karkasları, bağırsak orijinli *Salmonella* spp., *Escherichia coli* 0157:H7 ve *Clostridium perfringens* gibi patojen bakterilerle kontamine olabilmektedir. Örneğin, ABD'de her yıl yaklaşık 76 milyon kişinin gıda kaynaklı hastalıklardan etkilendiği, 325 000 kişinin hastanede tedavi altına alındığı ve 5 000 kişinin ise öldüğü bildirilmektedir (Le Loir ve ark., 2003; Nyachuba, 2010).

Kasaplık hayvanların deri ve mukozalarında normal olarak bulunan *S. aureus,* karkaslarda kesim hijyeninin uygun olmamasına bağlı olarak da bulunabilmektedir. Bu durum, gıda kaynaklı intoksikasyonların oluşumunda önem arz etmektedir ve *S. aureus* dünyada rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklar içerisinde üçüncü sırada yer almaktadır (Jablonksy ve Bohach, 1997; Zhang ve ark., 1998). *S. aureus,* insan ve hayvanlarda önemli infeksiyon ve bakteriyemilere yol açan bir patojendir. Gıdalarda yaygın olarak bulunmasından dolayı, gıda kaynaklı intoksikasyonların oluşumunda da önemli bir yere sahiptir (Lowy, 1998; Reacher ve ark., 2000; Normanno ve ark., 2005). Özellikle etkenin sahip olduğu ısıya dirençli stafilokokal enterotoksinler (SE) patojenite bakımından önemli olup, etken değişik tipte stafilokokal enterotoksinler üretilebilmektedir (Akineden ve ark., 2001; Normanno ve ark., 2005). Stafilokokal intoksikasyonlar, ısıya dirençli enterotoksin içeren gıdaların tüketimine bağlı olarak şekillenmektedir ve hastalığa özgü semptomlar 0.5-6 saat (genellikle 2 saat) gibi kısa sürede ortaya çıkmaktadır (Normanno ve ark., 2005).

Günümüzde, hayvan hastalıklarının tedavisi, büyüme ve gelişme artışı sağlamak amacıyla yaygın bir şekilde antibiyotik kullanılması sonucu mikroorganizmalarda şekillenen antibiyotik direnci, halk sağlığı açısından önemli sorunları da beraberinde getirmiştir (Barber ve ark., 2003). İlk kez 1961 yılında saptanan metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları tarafından oluşturulan

infeksiyonlar, bugün tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir (Witte ve ark., 2004).

Yukarıda belirtildiği gibi hijyenik koşullarda üretilmeyen et ve et ürünleri, gıda infeksiyon ve intoksikasyonlarının oluşumunda önemli rol oynamasına rağmen et, beslenme ve insan gelişimi için vazgeçilmez bir gıda kaynağıdır. Özellikle içerdiği biyolojik değeri yüksek proteinler ve ekzojen aminoasitler nedeniyle, insanların sağlıklı beslenmeleri için en önemli hayvansal protein kaynağıdır (Sentandreu ve ark., 2002).

Türkiye'de 2013 sonu itibariyle toplam büyükbaş hayvan varlığı 14 527 151'dir. Büyükbaş hayvanlar arasında yer alan sığır sayısı 14 415 257, koyun sayısı 29 284 247, keçi sayısı ise 9 225 548 olarak belirtilmiştir (Anon., 2013).

Dünyada sığır ve dana eti üretiminde en büyük payı % 20,6 ile ABD almaktadır ve AB ülkelerindeki üretim düzeyi ise % 14 seviyesindedir. Türkiye'nin üretimdeki payı % 1,6-1,8 civarındadır. Dünya sığır eti üretim miktarı 62 737 (bin ton) olarak değerlendirilmektedir. Bu üretimde en yüksek payı 11 173 (bin ton) ile ABD, 9 399 (bin ton) ile Brezilya, 7 997 (bin ton) ile AB takip etmektedir. Türkiye ise 996 (bin ton) üretim değerine sahiptir (Anon., 2012; Anon., 2013).

Hayvansal ürünlerin tüketim değerleri, ülkelerin gelişmişlik düzeyinin belirlenmesi açısından önemli bir kriterdir. Türkiye'de yıllık kişi başı ortalama kırmızı et tüketimi 12,9 kg olup, bu değer Amerika'da 107,5 kg, Arjantin'de 96,1 kg, Brezilya'da 95,1 kg, Avustralya'da 91,4 kg, Kanada'da 82,7 kg, AB'de 77,1 kg, Rusya'da 58,7 kg'dır (Fapri, 2012). Türkiye'de tüketim değerlerinin düşük olmasının sebebi, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kımızı etin diğer gıdalara göre pahalı olmasıdır (Yaylak ve ark., 2010; Anon., 2013).

S. aureus; gıda intoksikasyonları, pnömoni, yara infeksiyonları ve nazokomiyal bakteriyemiler açısından önemli bir bakteridir (De Boer ve ark., 2009). *S. aureus*'un gıdalarda bulunuşu genellikle gıda hazırlama birimlerinde çalışan kişilerin kontaminasyonu ile olur. Ayrıca *S. aureus* deri florasında doğal olarak bulunduğu için piliç etinde ve diğer çiğ etlerde de bulunabilmektedir (Bergdoll ve Wong, 2006).

1.1. Tarihçe

Stafilokokal gıda zehirlenmelerine benzer hastalıkların ortaya çıkışı ile ilgili yeterli kayıt bulunmamasına rağmen, insanların tarihte karşılaştıkları gıda kaynaklı çoğu problemin stafilokoklar ile ilgili olduğu muhtemeldir. Bu tip zehirlenmelere ilişkin kayıtlar 1830'un ilk zamanlarına kadar uzanmasına rağmen, stafilokoklar Robert Koch tarafından 1878 yılında tanımlanmış ve Louis Pasteur tarafından da 1880 yılında sıvı besiyerinde üretilmiştir. Alexander Ogston, yaptığı mikroskobik inceleme ile mikroorganizmaların üzüm salkımı formunda olduğunu görmüş ve bu mikroorganizmaları; Yunanca 'üzüm salkımı' anlamına gelen, '*Staphylococcus*' olarak isimlendirmiştir (Ogston, 1882; Bergdoll ve Wong 2006).

Rosenbach, beyaz ve sarı pigmentasyonda iki tip koloniyi 1884 yılında insanlardan izole etmiştir. Beyaz tip kolonileri *S. albus*, sarı tip kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir. *S. albus*, 1970 yılında *S. epidermidis* olarak isimlendirilmiştir (Schneewind ve Missiakas, 2009).

Stafilokokal gıda zehirlenmesi veya gıda kaynaklı intoksikasyon sendromu ile ilgili ilk çalışmalar; 1894 yılında J. Denny ve sonra 1914 yılında M.A. Barber'in, *S. aureus* ile kontamine ettikleri sütü tüketmeleri ve ortaya çıkan semptomları gözlemlemeleri ile olmuştur. *S. aureus'*un gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açtığı ise 1930 yılında Dack ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucunda kesinlik kazanmıştır (Jay ve ark., 2005).

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

Stafilokok terimi, küçük ve küre şeklinde olan Gram pozitif bakterileri tanımlamak için kullanılır. Bakteri çapı 0,5 – 1,5 µm arasında değişmektedir. Stafilokoklar hücre duvarında bulunan peptidoglikan ve teikoik asit nedeniyle tipik Gram pozitif özellik gösterirler. Bazı türler (Toplum kaynaklı MRSA / CA-MRSA) hariç olmak üzere β-laktam, tetrasiklin, makrolid, linkosamid, novobiyosin ve kloramfenikol gibi çoğu antibiyotiğe duyarlıdır (Seo ve Bohach, 2007).

S. aureus, önceki yıllarda yapılan klasifikasyonda *Micrococcaceae* familyasında yer almasına rağmen yeni klasifikasyonda *Bacilli* sınıfında *Bacillales* takımında *Staphylococcaceae* familyasında yer almaktadır. Bu takımda 7 familya

bulunmaktadır ve veteriner hekimlikte önemli *Listeriaceae, Bacillaceae* ve *Staphylococcoceae* familyaları da *Bacillales* takımında bulunur. *Staphylococcoceae* familyasında *Staphylococcus, Gemella, Jeotgalicoccus, Macrococcus* ve *Salinococcus* olmak üzere 5 soy vardır. *Staphylococcus* soyunda 36 tür ve 18 alttür bulunmaktadır ve gıda kaynaklı hastalıklar açısından en önemli patojen tür *S. aureus* olarak bilinmektedir (Garrity ve ark., 2004; Schneewind ve Missiakas, 2009).

S. aureus, Gram-pozitif, fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz ve koagulaz pozitif bir bakteridir. Mikroskobik incelemede bakteri kümeleri tipik üzüm salkımı şeklinde görülmektedir. Stafilokokların hücre duvarı lizozime dirençli, lizostafine ise duyarlıdır (Le Loir ve ark., 2003). Termonükleaz (TNase) üretimi, *S. aureus'*un karakterizasyonunda önemli bir parametredir. TNase üreten koagulaz pozitif türlerden *S. delphini* hariç sadece *S. aureus* aerobik ve anaeorobik olarak mannitolu fermente edebilir ve protein A ile asetoin üretebilir. Agarda altın sarısı renginde koloni oluşturması karakteristiktir. İnsanların burun, deri ve mukoz membranlarında normal olarak bulunabilir (Bergdoll ve Wong 2006; Todar, 2005).

Koagulaz enzimi ile plazmanın koagulasyonu sonucu meydana gelen fibrin pıhtısı bakterinin etrafını sararak bakteriyi fagositozdan korur. Koagulaz testi, *S. aureus*'u koagulaz negatif diğer stafilokoklardan ayırmak için kullanılır. Çoğu *S. aureus* türü bağlı (clumping faktör) ve serbest olmak üzere iki tip koagulaz enzimine sahiptir. Serbest koagulaz ısıya duyarlıdır ve hücre dışı olarak sentezlenmektedir. Bağlı koagulaz ise ısıya dirençli olup hücre duvarının yüzeyine yerleşmiştir (Rao, 2006).

S. aureus, çoğu çevresel koşulda yaşayabilme ve kolonize olma yeteneğine sahip bir bakteridir. Septisemi, meningitis, toksik şok sendrom, gıda zehirlenmeleri ve deri hastalıkları gibi yumuşak seyirli veya yaşamı tehdit eden birçok hastalığa sebep olabilir (Clements ve Foster, 1999).

S. aureus, ürettiği 30 farklı hücre dışı ürün ve stafilokokal enterotoksinler, toksik şok sendrom toksin-1, eksfoliatif toksin ve Panton-Valentine-Lökosidin (PVL) gibi bazı ekzoproteinler ile insan ve hayvanlarda ciddi infeksiyonlara yol açar. PVL, bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır ve deri infeksiyonları, furunkulozis ve şiddetli nekrotizan pnömonilerde izole edilen *S. aureus* infeksiyonlarında < % 5 oranında bulunmaktadır. Toplum kaynaklı MRSA infeksiyonlarının % 70-100'de

PVL gen bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına yol açan metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) türlerinde de PVL geni saptanmıştır (Sudagidan ve Aydin., 2010).

Çizelge 1.1. Bazı Stafilokok türlerinin genel özellikleri (Berdgoll ve Wong, 2006).

Özellikler	*S. aureus*	*S. intermedius*	*S. hyicus*	*S. delphini*
Pigmentasyon	+	-	-	-
Koagulaz	+	+	+/-	+
TNase	+	+	+	-
Mannitol (Aerobik)	+	+/-	-	+
Mannitol (Anaerobik)	+	-	-	-
Hemolizin	+	+/-	-	+
Clumping Faktör	+	+/-	-	-
Asetoin üretimi	+	-	-	-

1.3. *S. aures*'un Üremesi ve Toksin Oluşturması İçin Gerekli Faktörler

Stafilokoklar üremeleri için diğer Gram pozitif bakterilere benzer organik besinlere ihtiyaç duyarlar. Aminoasitleri nitrojen kaynağı olarak kullanırlar ve tiamin ile nikotinik asit gibi B grup vitaminlere ihtiyaçları vardır. Anaerobik olarak gelişimlerini sürdürebilmek için urasile gereksinim gösterirler (Jay ve ark., 2005). *S. aureus*'un aerobik olarak üremesi ve enterotoksin oluşumu için geliştirilen besiyerinde, monosodyum glutamat C, N ve enerji kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu besiyerinde üç aminoasit (arginin, sistin ve fenilalenin) ve dört vitamin (pantotenat, biyotin, niyasin, ve tiyamin) ile inorganik tuzlar kullanılmıştır. Arginin aminoasidinin stafilokokal enterotoksin B üretimi için gerekli olduğu anlaşılmıştır (Miller ve Fung, 1973; Sutherland ve Varnam, 2002).

1.3.1. Sıcaklık

S. aureus tipik mezofil bir bakteri olmasına rağmen bazı suşlar 6-7°C gibi düşük sıcaklıklarda üreyebilir. Üremeleri genellikle 7°C ile 47,8°C arasında değişmekle birlikte optimum olarak 35°C de gerçekleşir (Bennett ve Monday, 2003). Enterotoksin üretimi için gerekli sıcaklık derecesi ise 10°C ile 45°C arasında değişmek ile birlikte optimum 35-40°C arasındadır. Bu sıcaklık dereceleri üreme ve enterotoksin oluşturmakta etkili olan diğer faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. *S. aureus* ısıya toksinlerinden daha duyarlıdır ve 62°C ile 72°C'de desimal redüksiyon zamanı (D-değeri) sırasıyla 4,1 sn ve 25-60 sn olarak hesaplanmıştır. Ayrıca D- değerinin durgunluk fazındaki hücrelerde üç katına kadar arttığı da tespit edilmiştir. Toksinlerin ısıya direnci (100ºC'de 30 dk) ise oldukça fazladır (Jay ve ark., 2005; Adams ve Moss, 2008).

1.3.2. Tuz ve Diğer Kimyasallar

S. aureus, kültür ortamlarında NaCl'ye ihtiyaç duymadan üreyebilmesine rağmen, en iyi % 7-10 NaCl konsantrasyonda üreyebilmektedir. Bazı suşlar % 20 konsantrasyonda NaCl'ye tolerans gösterebilmektedir. Bu tolerans sınırı sıcaklık, pH, a_w ve E_h göre değişiklik gösterebilmektedir. *S. aureus*, tellürit, civa klorid, neomisin, polimiksin, ve sodyum azid gibi bazı kimyasallara da yüksek oranda tolerans gösterir ve bu kimyasallar kültür ortamlarında selektif ajan olarak kullanılır. *S. aureus*, diğer stafilokok türlerine göre akriflavine yüksek direnç göstermektedir (Jay ve ark., 2005).

1.3.3. pH, Su Aktivitesi (a_w) ve Diğer Parametreler

S. aureus'un ürediği optimal pH değer aralığı 6,0-7,0 minimal pH değeri 4,0 ve maksimal pH değeri 9,8-10 olarak belirtilmektedir. *S. aureus*'un üremek için ihtiyaç duyduğu su aktivitesi değeri en az 0,83, toksin oluşumu için ise bu değerin en az 0,86 olması gerekmektedir. pH koşullarına SEA'nın SEB'ye göre daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir (Adams ve Moss, 2008; Jay ve ark., 2005).

Çizelge 1.2. *S. aureus*'un üremesi ve toksin üretimi için gerekli koşullar (Adams ve Moss, 2008).

	Üreme		Enterotoksin Üretimi	
Faktör	**Optimum**	**Min/Maks.**	**Optimum**	**Min/Maks.**
Sıcaklık, °C	35-37	7-48	35-40	10-45
pH Değeri	6,0- 7,0	4,0- 9,8	SEA : 5,3- 6,8 Diğer: 6-7	4,0- 9,8
NaCl %	0.5-4.0	0-20	0.5	0-20
a_w Değeri	0,98>0,99	0,83>0,99	>0,99	0,86>0,99
Atmosfer	Aerobik	Aerobik-Anaerobik	% 5-20 DO_2	Aerobik-Anaerobik
E_h	>+200mV	<-200 >+200mV	>+200mV	-

1.4. *S. aureus* Ekzoproteinleri

S. aureus, memelilerde kolonize olabilen ve hastalık oluşturan çeşitli tiplerde ekzoprotein üretme yeteneğine sahiptir. Üretilen sekretlerin büyük bir çoğunluğu hemolizin (alfa, beta, gamma ve delta), nukleaz, proteaz, lipaz, hiyaluronidaz ve kollagenaz gibi bir grup enzimi ve sitotoksinleri içerir. Bu proteinlerin temel görevi, konak dokusunda bulunan ve bakteri üremesi için gerekli besinleri bakterinin kullanabileceği bir forma dönüştürmek olabilir. Bazı türler, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1), stafilokokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH ve SEI), eksfoliatif toksin (ETA, ETB) ve lökosidin gibi bir veya daha fazla ekzoprotein üretme yeteneğine sahip olabilir. Bu toksinlerin bazılarının immun sistem hücrelerini etkilemesi ile birlikte diğer biyolojik etkileri de mevcuttur. Ayrıca TSST-1 ve stafilokokal enterotoksinler, pirojenik toksin süperantijenleri (PTSAgs) olarak da bilinmektedir (Dinges ve ark., 2000).

1.4.1. Pirojenik Toksin Süperantijenleri (PTSAg'ler)

PTSAgs ekzotoksinleri, bazı biyolojik karakterlerindeki benzerliklerden dolayı hem *S. aureus* hem de *Streptococcus pyogenes* tarafından sentezlenebilmektedir. PTSAgs ekzotoksinleri içerisinde çoğu stafilokokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEH) olmak üzere, TSST-1 ve streptokokal pirojenik ekzotoksinler de (SPE A, B, C, F, G, H ve streptokokal süperantijen) bulunmaktadır. Bu ekzotoksinlerin

pirojenite ve süperantijenite özellikleri yanında endotoksinlerin letalitesini tavşanlarda 100 000 kat artırması gibi önemli özellikleri de mevcuttur. Stafilokokal enterotoksinler (SE) ise PTSAgs grup diğer toksinlerden farklı olarak emetik aktiviteye sahiptir. Ayrıca TSST-1 mukozal yüzeylerden geçebilir (Bohach ve ark., 1990). Streptokokal pirojenik ekzotoksinler (SPE), miyokardial nekrozisi önemli derecede uyarmaktadır. SPE A, endotoksinlere bağlanarak immun sistem üzerine toksik etki gösterirken, TSST-1 ise endotoksinlerin böbrek tubul hücreleri üzerine olan letal etkisini artırmaktadır (Leonard ve Schlievert, 1992).

PTSAg'lerin süperantijente özellikleri incelendiğinde; ekzotoksinlerin, T hücreleri proliferasyonunu, hücrelere spesifik olmamalarına rağmen uyardıkları görülmektedir. SE'de kapsayan pirojenik toksinlerin süperantijenik özellikleri, bu toksinlerin önemini göstermektedir (Fleischer ve Schrezenmeier, 1988).

Stafilokokal PTSAg'ler, foksiyonel benzerliklerinin yanında genetik ve biyokimyasal karakterleri bakımından da benzerlik gösterir. *S. aureus* tarafından sentezlenen çoğu protein gibi, PTSAgs'de eksponensiyel fazın sonunda üretilmektedir. Toksin genleri patojenite adaları olarak ifade edilen plasmidler, bakteriyofajlar veya heterolog genetik elementler tarafından taşınmaktadır. Accesory gen regulator (*agr*), staphylococcal accesory gen regulator (*sar*) ve katabolit baskı sistemi olmak üzere en az üç düzenleyici sistem tarafından da kontrol edilmektedir. PTSAg'ler küçük yapılı, glikolize olmayan ve molekül ağırlıkları 20 000-30 000 arasında değişen polipeptid moleküllerdir (Dinges ve ark., 2000).

1.4.2. Stafilokokal Enterotoksinler

SE karakterizasyonundaki en önemli gelişmeler stafilokokal gıda zehirlenmeleri ile ekzotoksinler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan 1930 yılındaki çalışmadan yaklaşık 20 yıl sonra gerçekleşmiştir. Bergdoll ve arkadaşları saflaştırılmış SE için hazırlıkları üreten ve spesifik antiserumları geliştiren ilk araştırmacılardır (Seo ve Bohach, 2007).

SE'in isimlendirilmesi, keşfedilmelerine göre alfabetik olarak yapılmıştır. SEF ve SEE olarak isimlendirilen toksinler SEA ve SEB olarak değiştirilmiştir. SEC, SED, SEE gibi klasik enterotoksinler ise 1962-1972 yılları arasında rapor edilmiştir.

Önceki yıllarda SEF, TSS ile birlikte seyreden *S. aureus* infeksiyonlarında üretilen bir toksin olarak kabul edilmekteydi. Günümüzde emetik aktivitesinin olmadığının anlaşılması üzerine TSS toksin 1 (TSST-1) olarak isimlendirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda INCSS (International Nomenclature Committee for Staphylococcal SAgs), klasik stafilokokal enterotiksinler (SEA-SEE) gibi protein yapısında olan fakat emetik aktivitesi doğrulanamayan toksinleri SEl (SE-like) toksin olarak isimlendirmiştir (Lina ve ark., 2004).

S. aureus çeşitli tipte (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, R ve U) toksin üretme kabiliyetine sahiptir. Ancak meydana gelen zehirlenmelerin % 95'inden sorumlu tutulan toksinler, klasik stafilokokal enterotoksinler olarak adlandırılan SEA, SEB, SEC, SED, SEE toksinlerdir (Pelisser ve ark., 2009).

Stafilokokal intoksikasyonların çoğu SEA tarafından oluşturulmaktadır ve bunu SEB ile SED tip intoksikasyonlar izler. SEA, SEB, SEC tipi toksinler daha çok insan, SEB yumurta ve balık, SEC tipi toksin sığır ve koyun, SED tip toksine ise kanatlılardan izole edilen suşlarda rastlanmaktadır. SEA ve SED tipi toksinin intoksikasyonlara daha çok rastlanmasında; toksinlerin asıl kaynağının insan olması, logaritmik üreme fazında primer metabolit olması ile SEA'nın farklı ve olumsuz koşullar (pH, E_h, a_w) altında oluşturulabilmesinden kaynaklanmaktadır. SEB ve SEC sekonder metabolit olarak ortaya çıktığı için logaritmik üreme fazının sonunda oluşabilmekte ve bu süre 20 saatten az olmamaktadır (Erol, 2007).

1.4.2.1. Stafilokokal Enterotoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

SE tek zincirli basit proteinlerden oluşmaktadır. Hidroliz yoluyla 18 aminoasit oluşur ve aspartik asit, glutamik asit, lizin ve tirozin yüksek oranda bulunmaktadır (Jay ve ark., 2005). Aminoasit dizilimi belirlenen ilk toksin SEB'dir. SEB'nin N-terminalinde glutamik asit, C-terminalinde ise lizin aminoasiti bulunmaktadır. SEA, SEB ve SEE 239-296 arasında değişen sayıda aminoasit rezidüsü içermektedir. SEC_3 236 aminoasit rezidüsü içerir ve N-terminalinde serine bulunurken SEC_1'in N-terminalinde glutamik asit bulunmaktadır. SEA, SED ve SEE aminoasit bileşimi yönünden benzerken, SEB ise SEC_1, SEC_2 ve SEC_3'e benzerlik göstermektedir. Enterotoksinler, proteolitik enzimlerden tripsin, kimotripsin, rennin ve papaine

dirençli iken pH-değeri 2,0 düzeyinde pepsin enzimine duyarlıdır (Berdgoll ve Wong, 2006, Erol ve İşeri, 2004).

Enterotoksinler, higroskopik özellik gösterirler ve tuzlu solüsyonlarda çözünebilme özelliğine sahiptirler. Molekül ağırlıkları 25 000 -29 000 Da arasında değişmektedir (Berdgoll ve Wong, 2006) .

Çizelge 1.3. Stafilokokal enterotoksinlerin bazı özellikleri (Jay ve ark., 2005).

SE	Moleküler Ağırlık (Da)	Izolektrik Noktası	İdentifikasyon Yılı	Toksin Geni Lokusu
A	27 100	6,8	1960	Kromozomal
B	28 366	8,6	1959	SaPI
C_1	34 100	8,6	1967	-
C_2	34 000	7,0	1984	-
C_3	26 900	8,15	1984	-
D	27 300	7,4	1979	Plazmid
E	29 600	7,0	1971	Kromozomal
G	27 043	-	1992	-
H	27 300	5,7	1995	-
I	34 928	-	1998	-
J	-	-	1998	-
K	26 000	7,0-7,5	2001	SaPI
L	-	-	2001	-

SE'lerin en önemli özelliği ısıya olan direncidir. Toksinler, biyolojik aktivitelerini ısı işleminden sonra da korumaktadır. Kontamine gıdanın alınmasından sonra toksinler sindirim sisteminden emilir ve kana geçer. Toksinlerin kusma refleksini aktive etmesi sonucunda mide bulantısı, kusma, abdominal kramp ve diyare oluşur (Holeckova ve ark., 2002). SE'lerin ısı uygulamalarına direnci ile ilgili yapılan çalışmalarda SEA ve SEB'nin 100°C'de 90 dakikada, 120°C'de 30 dakikada, SEC'nin 100°C'de 180 dakikada, 120°C'de 60 dakikada tamamen inaktive oldukları tespit edimiştir. Termal dirençte; toksinin saflığı, serolojik tipi, toksin miktarı, ısı işlemi uygulanan medium, ortamın pH değeri ile teşhis ve saptama yöntemi etkilidir (Berdgoll ve Wong, 2006; Erol ve İşeri, 2004).

1.4.2.2. Stafilokokal Enterotoksinlerin Genetik Özellikleri

SE'ler, filogenetik ilişki, yapı ve dizilim homolojisini paylaşan stafilokokal ve streptokokal pirojenik ekzotoksinlerden (PT) oluşan geniş bir familya içerisinde bulunmaktadır. Bu gruba stafilokokal enterotoksinler, toksik şok sendrom toksininin iki formu (TSST) ve streptokokların bir grubu (SPE A, B, C, F, G, H, J) ve streptokokal süperantijen dahildir (Balaban ve Rasooly, 2000; Dinges ve ark., 2000).

1.4.2.3. Enterotoksinlerin Süperantijen Aktiviteleri

Membrana bağlı T hücre reseptörleri (TCR- T cell reseptör) tarafından antijenlerin tanınması hücre içinde meydana gelen immun cevapta temel işlevdir. TCR, glikolize polimorfik bir heterodimerdir ve alfa ile beta veya gama ile sigma zincirlerinden oluşmaktadır. Antijen sunan hücreler (APC-Antigen presenting cell) üzerinde MHC sınıf I ve II (Major histocompatibility complex class I, II) molekülleri bulunmaktadır. Süperantijenler (SAg'ler) MHC sınıf II moleküllerine bağlanarak bir kompleks oluştururlar ve bu şekilde TCR ile etkileşime geçerler. Bazı SE'lerin MHC sınıf II moleküllerine yüksek düzeyde bağlanmasında Zn^{+2} iyonları etkilidir. SAg'ler β-zinciri üzerinde farklı bölgeler üzerine nonspesifik olarak bağlanıp geleneksel antijenlerden daha yüksek düzeyde T hücresini aktive edebilme kabiliyetine sahiptir (Balaban ve Rasooly, 2000; Pettersson ve Forsberg, 2002; Seo ve Bohach, 2007).

1.4.2.4. Stafilokokal Enterotoksinler

1.4.2.4.1. Stafilokokal Enterotoksin A (SEA)

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde en yaygın rastlanan toksin SEA'dır. SEA'yı kodlayan *entA* geni bir bakteriyofaj tarafından taşınmaktadır. DNA hibridizasyon analizleri sonucunda; bu fajın karşılıklı gen aktarımı ve sirkülarizasyonunun bakteriyel kromozom içerisinde tamamlandığı tespit edilmiş ve *entA* geninin faj bağlanma bölgesinin yakınında yerleştiği anlaşılmıştır. *sea* geni 771 baz çiftinden

oluşur ve enterotoksin A prekürsörünün kodlanmasının 271 aminoasit rezidüsü ile sağlandığı bildirilmiştir. Bu yapıda 24- rezidülük bir N-terminal hidrofobik ön dizilimi işlenmekte ve 27 100 Da molekül ağırlığındaki SEA'nın son şekli oluşturulmaktadır (Balaban ve Rasooly, 2000).

SEA, logaritmik büyüme fazının ortasında sentezlenmektedir. Bu nedenle gıda intoksikasyonlarında en sık rastlanan toksindir. *seb, sec, sed* aksine *agr* tarafından kontrol edilmez. *seb, sec, sed agr*'nin tam fonksiyon çalışmasına ihtiyaç duyar (Tremaine, 1993).

1.4.2.4.2. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB)

SEB, *entB* geni tarafından kodlanmaktadır ve bu gen 900 nükleotid içermektedir. SEB prekürsör proteinleri 267 aminoasitten (31 400 Da) oluşur ve 27 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidini içine alır. Gıda zehirlenmelerinden izole edilen klinik *S. aureus* izolatlarında e*ntB* geni kromozomal olarak yerleşmesine rağmen (Shafer ve Iandolo, 1978) diğer bakteri suşlarında ise 750 kb'lik bir plazmid ile taşınmaktadır (Shalita ve ark., 1977).

1.4.2.4.3. Stafilokokal Enterotoksin C (SEC)

SEC, antijenik olarak SEC1, SEC2 ve SEC3 olmak üzere üç alt tipe ayrılmıştır. *entC3* geni 801 baz çiftinden oluşmaktadır ve SEC1 ile % 98 oranında nükleotid sekans benzerliği göstermektedir (Balaban ve Rasooly, 2000).

1.4.2.4.4. Stafilokokal Enterotoksin D (SED)

SED, gıda kaynaklı zehirlenmelerden izole edilen toksinler içerisinde en yaygın ikinci toksindir. SED toksinini kodlayan *ent-D* geni, 27,6 kb'lık penisilaz plazmidi üzerinde lokalize olmuştur ve 30 aminoasitlik sinyal peptidi içeren 258 aminoasitlik prekürsör proteini kodlar. 228 aminoasitlik olgun polipeptid diğer SE'lerin dizilimine yüksek düzeyde benzerlik gösterir. SED süperantijeninin, MHC sınıf II

moleküllerine olan yüksek affinitesi $Zn^{+2'}$ye bağlıdır. Bu nedenle SED, Zn^{+2} ile tekrar kristalize olabilmektedir (Sundstrom ve ark., 1996).

1.4.2.4.5. Stafilokokal Enterotoksin E (SEE)

SEE, *ent-E* geni tarafından 26 kDa molekül ağırlığa sahip olgun protein ile kodlanmaktadır. Yapılan DNA dizi analizleri sonucunda; SEE, SED ve SEA'nın birbirlerine yakınlık gösterdikleri anlaşılmıştır. SEE, SEA ile yüksek düzeyde (%81) sekans benzerliği göstermektedir. SEE, stafilokokal gıda zehirlenmelerinde sıklıkla izole edilmemektedir (Balaban ve Rasooly, 2000).

1.4.2.4.6. Stafilokokal Enterotoksin G (SEG)

Aminoasit düzeyi 258 olan bir prekürsör proteini *entG* geni tarafından kodlamaktadır. SpeA, SEB, SEC ve SSA (Streptokokal süperantijen A) en çok benzeyen toksindir (Munson ve ark., 1998).

1.4.2.4.7. Stafilokokal Enterotoksin H (SEH)

SEH, son zamanlarda keşfedilen bir toksin tipidir ve 27 300 dalton molekül ağırlığına sahiptir. Toksini oluşturan aminoasit sekansının amino (NH_2) ucu SEH tipine özgüdür ve daha önce identifiye edilen toksinler ile herhangi bir çapraz reaksiyon oluşturmadığı saptanmıştır (Balaban ve Rasooly, 2000).

1.4.2.4.8. Stafilokokal Enterotoksin I (SEI)

Gen *entI,* 729 nukleotid içerir ve 242 prekürsör proteni kodlayan aminoasit ile sonlanır. Molekül ağırlığı 24 928 olan bu toksin tipi diğer enterotoksinler ile en az benzerliğe sahiptir. En fazla benzerlik gösterdiği toksin tipleri % 26-28 aminoasit oranıyla SEA, SEE ve SED'dir (Munson ve ark., 1998).

1.4.2.4.9. Stafilokokal Enterotoksin J (SEJ)

Gen *entD,* bir plazmid tarafından kodlanmaktadır. Bu plazmid üzerinde bulunan enterotoksin D ve J'nin açık okuma bölgeleri zıt yönlerde yer almaktadır ve 895 nukleotid içeren intergenik bir bölge sayesinde ayrıldığı saptanmıştır. SEA, SEE ve SED ile % 64-66 sekans benzerliği gösteren SEJ, 269 aminoasitten oluşmaktadır. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda, *entJ* determinantlarının bütün SED'leri kodlayan plazmidlerde bulunabileceği saptanmıştır (Zhang ve ark., 1998).

1.4.2.5. Toksik Şok Sendrom Toksin-1 (TSST-1)

TSST-1, kromozomal olarak yerleşim gösteren 15,2 kb büyüklüğündeki mobil genetik element, stafilokokal patojenite adası 1 içerisinde bulunan *tstH* (H: Human: İnsan) geni tarafından kodlanmaktadır. TSST-1, yüksek oranda hidrofobik aminoasit içermesi sebebiyle su içerisinde çözünebilmektedir. Isı işlemi ve proteolizise ise dayanıklıdır. TSST-1, 1 saat süresince kaynatma işlemine tabi tutulması ve uzun süre tripsin ile muamele edilmesi sonucunda, biyolojik aktivitesinde herhangi bir kayıp olmadığı anlaşılmıştır. TSST-1'de emetik özellik bulunmamaktadır (Dinges ve ark., 2000).

1.4.3. Eksfoliyatif Toksin

Eksfoliyatif toksinler çoğunlukla bebek, çocuk ve erişkinlerde Staphylococal Scalded Skin Syndrome (SSSS) (Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu) adı verilen hastalığa sebep olmaktadır. Deri semptomları küçük bir alan ile lokalize olabildiği gibi, bütün vücudu kaplamış bir şekilde de görülebilmektedir. Bu durum toksin antijenlerine karşı vücudun vermiş olduğu antikor tepkisi ile ilgili olarak değişiklik gösterebilir. SSSS'de mortalite, çocuklarda daha az fakat erişkinlerde diğer hastalıklarla beraber seyrettiği zaman % 50'ye kadar çıkabilir. Hastalık teşhisi, ateş ile birlikte seyreden deri lezyonları ile yapılabilir (Ladhani ve ark., 1999).

S. aureus, antijenik olarak birbirinden farklı dört eksfoliyatif toksin üretmektedir. Eksfoliyatif A ve Eksfoliyatif B toksinleri insanlarda görülen SSSS

hastalığından sorumlu toksin serotipleridir. ETA, moleküler ağırlığı 26 950 Da'dur ve 242 aminoasit içerir, ısı işlemine dayanıklıdır. ETA toksinini kodlayan gen, kromozomal olarak yerleşim gösterir. ETB, molekül ağırlığı 27 274 Da ve 246 aminoasit içerir ısı işlemine duyarlıdır. ETB toksinini kodlayan gen, plasmid olarak yerleşim gösterir. *S. aureus,* ayrıca ETC toksinin üretir, 27 kDa molekül ağırlığındaki bu toksin at deri infeksiyonlarından izole edilmiştir. ETD, klinik *S. aureus* izolatlarında *eta* ve *etb* gen problarının görüntülenmesi sırasında izole edilmiştir. ETD 27 kDa molekül ağırlığındadır ve ETA ile % 40, ETB ile % 59 ve ETC ile % 13 sekans benzerliği bulunur (Balaban ve Rasooly, 2000).

1.4.4. Hemolizin ve Lökosidin'in Yapısal Biyolojisi

S. aureus, birkaç sitotoksik molekül üretme kabiliyetine sahiptir. Bu moleküller dört gruba ayrılır ve dört adet hemolizin (Alfa, Beta, Gama, Delta Hemolizin) ile Panton-Valentine Lökosidin (PV Lökosidin) olarak isimlendirilir (Prevost ve ark., 1995a).

1.4.4.1. Alfa Hemolizin (Alfa Toksin)

Alfa hemolizin, üzerinde en çok inceleme yapılan *S. aureus* sitotoksinidir. Çoğu *S. aureus* türü bu toksini üretme kabiliyetine sahiptir ve toksin birçok memeli hücresi üzerine etkilidir. Özellikle tavşan eritrositleri üzerine etkili olması ile birlikte dermonekrotik ve nörotoksik aktiviteye sahiptir. Tavşanlara damar içi olarak verilen 1µg alfa toksin, kuvvetli öldürücü bir etkiye sahiptir (Dinges ve ark., 2000).

Alfa hemolizin üretimini kodlayan gen *hla, S. aurues* kromozomunda bulunmaktadır. Toksin üretimi *agr* kontrolü dışında şekillenir ve çevresel faktörler alfa hemolizin üretiminde önemli rol oynar. *S. aureus* tarafından sentezlenen alfa hemolizin monomerleri hedef hücre membranı ile birleşerek silindirik hepatamerleri oluşturur. Bu form ökaryot hücreleri lize etme özelliğine sahiptir. Özellikle eritrositler toksin tarafından lize edilebilmektedir. Tavşan eritrositleri diğer memeli eritrositlerine göre 100 kat, insan eritrositlerine göre ise 1 000 kat daha duyarlıdır (Bernheimer ve Schwartz, 1963).

Hücre membranına bağlanan silindirik heptamerler 1-2 nm porlar şekillendirir. Bu porların oluşumu ile ilgili kesin bir veri olmamakla birlikte, alfa toksin N-terminal bölgesinin hemolitik porların açılmasında önemli bir rol oynadağı belirtilmektedir. Hücre membranında şekillenen por oluşumu ile beraber K^+ ve diğer küçük moleküller hücre dışana çıkarken Na^+, Ca^{++} gibi iyonlar ile molekül ağırlığı 1 000 den küçük olan moleküllerin hücre içine girişi şekillenir ve ozmotik basınçta meydana gelen değişimler sonucunda eritrositler lize olur (Dinges ve ark., 2000).

1.4.4.2. Beta Hemolizin (Sfingomyelinaz C)

S. auerus beta hemolizini ilk olarak 1935 yılında koyun eritrositleri için hemolitik, tavşan eritrositleri için hemolitik olmamasına göre Glenny ve Stevens tarafından identifiye edilmiştir. Toksin hemolitik aktivitesini 10°C altında ve 37°C sıcaklıkta gösterebildiği için "sıcak-soğuk hemolizini" olarak da adlandırılır. Toksin molekül ağırlığı 35 kDa ve salgılanması *hlb* geni tarafından kontrol edilmektedir. Toksinin 1 ng'ı 115 000 koyun eritrositini ve 82 000 insan eritrositini lize etme yeteneğine sahiptir (Dinges ve ark., 2000).

Beta hemolizini, özellikle hayvan kaynaklı olarak izole edilen birçok *S. aureus* türü tarafından sentezlenir. Çoğu ekzoprotein sentezine benzer şekilde beta hemolizin sentezi de geç eksponensiyel fazda şekillenmektedir (Bernheimer ve ark., 1974).

1.4.4.3. Gamma Hemolizin ve PV-Lökosidin (İki Komponent Toksin)

S. auerus, gamma hemolizin ve Panton-Valenine (PV) Lökosidin olmak üzere iki komponentli toksinleri sentezler. Bu iki toksin S ve F adı verilen iki komponentten oluşmaktadır. Gamma hemolizin hemen hemen tüm *S. auerus* türleri tarafından sentezlenebilirken, PV-lökosidin *S. auerus* türlerinin yaklaşık % 2-3 kadarı tarafından sentezlenir. Toksinler, nötrofil ve makrofajlar üzerine etkilidir. Ayrıca gamma hemolizin çoğu memeli eritrositini lize etme yeteneğine sahiptir. Gamma hemolizin agar üzerinde yaptığı inhibitör etki nedeniyle kanlı agarda tespit edilemez (Prevost ve ark., 1995a).

Araştırmalar, toksin komponentlerinin *S. auerus* genomunun farklı lokuslarında bulunduğunu göstermiştir. Her iki toksini de içeren *S. auerus* suşlarında, üç S komponenti (HlgA, HlgC ve LukS-PV) ve iki F komponenti (HlgB ve LukF-PV) bulunmaktadır (Prevost ve ark., 1995b).

Gamma hemolizin, kromozomal olarak yerleşim gösteren *hlg* lokusundaki *hlgA, hlgB ve hlgC* genleri tarafından kodlanır. Bu üç genin kodladığı proteinler de (HlgA, HlgB, HlgC) birleşerek molekül ağırlığı 32 000 olan proteini oluşturur. PV-lökosidin, lukS-PV ve lukF-PV genleri tarafından kodlanır. PV-lökosidin polimorf nükleer lökositlerde granül sekresyonunu ve yangısal mediatörlerin salınmasını uyardığı tespit edilmiştir (Dinges ve ark., 2000).

1.4.4.4. Delta Hemolizin (Delta Toksin)

Delta hemolizin, çeşitli memeli hücrelerinde membran hasarına yol açmaktadır. Bu protein, *S. aureus* türlerinin % 97'si tarafından üretilir ve *S. haemolyticus* tarafından üretilen protein ile immunolojik olarak yakınlık gösterir. Toksin üretimi *hld* tarafından kodlanır ve *agr* tarafından kontrol edilmektedir. Delta hemolizin, diğer çoğu stafilokokal ekzoprotein gibi logaritmik üreme fazının son evresinde üretilmektedir. Delta toksin sitotoksik etkiye sahiptir ve hastalıkların etiyolojisindeki önemi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Dinges ve ark., 2000).

1.5. *S. aureus* Antibiyotik Direnci ve Mekanizması

Bakteriler tarafından antibiyotiklere karşı oluşturulan direnç, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi halini almıştır. Antibiyotiklerin tarım, hayvancılık ve tıp alanında yoğun kullanımı sonucu bakteriler antibiyotiklere karşı direnç kazanmıştır. Antibiyotiklerin özellikle gıda üretimi amacıyla üretilen hayvanlara tedavi amacıyla ve gelişim arttırıcı olarak yoğun bir şekilde kullanılması insan sağlığı açısından da önemli bir risk oluşturmaktadır. (Normanno ve ark, 2007b).

Son yıllarda yapılan çalışmalar *S. aureus*'un penisilin, sefalosporin, eritromisin, metisilin, oksasilin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin gibi çoğu

antibiyotiğe karşı direnç oluşturduğunu göstermiştir (Gündoğan ve ark., 2005; Normanno ve ark., 2007a; Pereira ve ark., 2009, Sudagidan ve Aydın, 2010).

1.5.1. Beta-Laktam Direnci

Beta-laktam antibiyotikler, antimikrobiyel etkilerini bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek göstermektedirler. β-laktam antibiyotiklere karşı şekillenen direncin oluşmasında iki önemli mekanizma etkili olmaktadır. Birinci direnç mekanizmasında bakteri tarafından üretilen penisilase ve BlaZ gibi enzimler ile hidrolitik olarak penisilin grupları parçalanır ve beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç bu şekilde gerçekleşir. İkinci ve genellikle şekillenen direnç mekanizmasında ise *mecA* tarafından kodlanan ve penisilin bağlayan proteinler olarak adlandırılan PBP, PBP2a proteinlerinin sentezi sırasında oluşan değişiklikler ile direnç oluşmaktadır. PBP'lerde meydana gelen değişikler kromozomal mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Bu mutasyonlar sonucunda PBP'nin β-laktam antibiyotiğe direnci azalmakta veya düşük affiniteli yeni PBP'ler sentezlenmektedir (McCallum ve ark., 2010).

1.5.1.1. Penisilin Direnci

S. aureus'un penisilin grubu antibiyotiklere karşı oluşturduğu direnç ilk olarak 1941 yılında ortaya çıkmıştır. Bu direnç, penisilinlerin terapötik amaçlı kullanımından sadece 2 yıl sonra gerçekleşmiştir. Penisilin direnci 1960 yılının sonlarına doğru hem toplum hem de hastane kaynaklı izolatların % 80'inde saptanmıştır (Lowy, 2003). Penisilin direnci plasmidlere bağlı olarak şekillendiği için diğer türler arasında hızlı bir dağılım göstermiştir ve 1980'li yıllarda klinik *S. aureus* izolatlarının % 90'ından fazlasının penisilinaz üretme yeteneğinde olduğu saptanmıştır (Pesavento ve ark., 2007).

Stafilokoklarda penisilin direnci β-laktamaz enzimini kodlayan *blaZ* geni varlığında gerçekleşmektedir. *blaZ* geni antireseptörü olan *blaR1* ve reseptörü olan *blaI* regülatör genlerinin kontrolü altındadır. Enzim etksini β-laktam halkasını hidrolize ederek gösterir ve stafilokoklar bu enzimi beta-laktam antibiyotiklere maruz kaldıkları zaman sentezlemektedir (Zetola ve ark., 2005).

1.5.1.2. Metisilin Direnci

Metisiline dirençli stafilokoklar, metisilinin klinik olarak kullanıma sunulmasından hemen sonra ortaya çıkmıştır. MRSA'dan kaynaklanan ilk salgın 1960 yılının başlarında Avrupa'da ortaya çıkmıştır. Bu tarihten itibaren MRSA dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (Chambers, 1997).

Metisiline karşı şekillenen direnç *BlaZ* geni varlığında oluşan β-laktamaz enzimi ile meydana gelir. MSSA izolatlarında beş adet PBP bulunmaktadır. MRSA izolatlarında ise bunlara ek olarak PBP2a olarak adlandırılan penisilin bağlayan proteinde bulunmaktadır. Metisiline karşı oluşan direnç, PBP2a oluşumunda meydana gelen değişiklik sonucu β-laktam antibiyotiklere karşı affinitede azalma şekillenmesi ile oluşmaktadır. MRSA, doğal olarak tüm β-laktam antibiyotiklere dirençlidir (Livermore, 2000). *mecA* geni PBP2a proteinini kodlar ve stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCCmec; staphylococcal casette chromosome *mec*) adı verilen mobil bir genetik eleman ile taşınır. Duyarlı bir *S. aureus* suşu SCC*mec* adasına sahip ise MRSA'ya dönüşebileceği bildirilmiştir (Zetola ve ark., 2005; Chambers, 1997).

PBP2a, hücre membranına bağlı olan peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanması için gereken transpeptidasyon reaksiyonunu katalize etmektedir. PBP'ler, β-laktamaza dayanıklı β-laktam antibiyotikleri ile inhibe olsa bile, PBP2a sayesinde hücre duvarı sentezi devam etmektedir. MRSA türlerinin tespiti, PCR yöntemi kullanarak *mecA* geninin varlığının doğrulanması ile yapılabilir (Normanno ve ark., 2007b; Vanderhaeghen ve ark., 2010).

mecI ve *mecR1* genleri, *mecA* promoter bölgesinin hemen üzerinde lokalize halde bulunmaktadır. Bu genlerin, β-laktamaz enzimini kodlayan *blaZ* geninin regülatörleri olan *blaR1* ve *blaI* ile homolog yapıda oldukları anlaşılmıştır. *mecI* geni *mecA* transkripsiyonunu baskılayan MecI proteinini, *mecR1* ise membrana bağlı sinyal transdüksiyon proteini olan MecR1'i kodlamaktır. *mecA* geninin regülasyonu sonucu β-laktam antibiyotiklere verilen yanıt ile bakterinin penisiline maruz kalması sonucu *blaR1* ve *blaI* genlerinin *blaZ* genini regüle etmesi bu iki gen için benzerdir (Chambers, 1997).

Metilisilin direnci oluşmasında *mecA* geni dışında *femA* geni de etkilidir. *femA* geni ürünü 48-kDa bir proteindir ve hücre duvarı metabolizmasını bozarak etki gösterir (Mehrotra ve ark., 2000).

S. aureus izolatları, *mecA* genine sahip olmamasına rağmen oksasilin, sefoksitin gibi metisilin duyarlılığını belirleyen testler ile pozitif sonuç verebilmektedir. Bu durumun muhtemel sebepleri arasında ise *mecA* homoloğu olan ve yeni tespit edilen *mecC* geni ile diğer β-laktam direnci sağlayan faktörler gösterilebilir (Garcia-Alvarez ve ark., 2011; Petersen ve ark., 2013).

1.5.2. Glikopeptid Direnci

Glikopeptid grubu antibiyotikler günümüzde MRSA infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Vankomisin ve teikoplanin bu grup antibiyotikler arasında bulunmaktadır. Vankomisin, *Streptomyces orientalis*'ten teikoplanin ise *Actinoplanes teichomyceticus*'tan elde edilmiştir. Glikopeptid grubu antibiyotikler, hücre duvarı sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Sentezlenmekte olan hücre duvarının bir komponenti olan peptidoglikanın D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon basamağını inhibe ederler (Shorr, 2007).

Vankomisinin metisiline dirençli stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılması sonucunda, stafilokoklar vankomisine direnç kazanmıştır. İlk olarak 1997 yılında Hiramatsu ve arkadaşları vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA klinik izolatını Japonya'da tanımlamıştır. Daha sonra diğer ülkelerde de rapor edilen bu olgular, vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus*'tan (VISA; vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*) kaynaklandığı anlaşılmıştır (Hiramatsu ve ark., 1997; Lowy, 2003; Pesavento ve ark., 2007).

S. aureus'ta şekillenen glikopeptid direncinin oluşmasında iki önemli mekanizma etkili olmaktadır. Birinci mekanizmada oluşan direnç kromozomal olup izolatlarda vankomisine karşı azalan bir duyarlılık mevcuttur ve VISA suşlarında gözlenmektedir. Vankomisin MIC değeri 8-16 µg/ml düzeyindedir. Vankomisine karşı azalan duyarlılık peptidoglikan biyosentezindeki değişiklikler sonucu ortaya çıkar ve buna bağlı olarak da VISA suşlarının düzensiz şekilde, kalınlaşmış hücre duvarına sahip oldukları anlaşılmıştır. İkinci mekanizmada, vankomisine dirençli

Enterococcus faecalis'den *vanA* geninin muhtemel konjugasyonu ile VRSA (Vankomycin resistant *S. aureus*) suşlarının oluştuğu saptanmıştır. VRSA suşlarının MIC değeri ≥128 μg/ml düzeyinde vankomisine dirençli oldukları tespit edilmiştir. VRSA'nın plasmid aktarımı ile hızlı bir şekilde yayılabileceği bildirilmiştir. (McGallum ve ark., 2010).

1.5.3. Aminoglikozid Direnci

Aminoglikozidler geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Protein sentezi sırasında, ribozomda hatalara neden olup translokasyon aşamasının yanlış okunmasına veya engellenmesine sebep olurlar. Ribozomal, enzimatik veya permeabiliteye bağlı olmak üzere üç şekilde direnç ortaya çıkmaktadır. *S. aureus*'ta en sık şekillenen direnç enzimatik olarak gözlenmektedir. Plasmid ve transpozonlar tarafından kodlanan asetiltransferaz, nükleotidiltansferaz ve fosforiltransferaz enzimleri ile antibiyotiğin yapısı değiştirilerek inaktivasyonu sağlanmaktadır (McCallum ve ark., 2010).

1.5.4. Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklinler, geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Hayvancılıkta büyüme faktörü olarak, veteriner tıp alanı ile insanlarda bakterilere karşı tedavi amaçlı ve tarımsal üretimde kullanılmaktadır. Bu geniş kullanımlarından dolayı birçok bakteride tetrasiklinlere karşı direnç şekillenmiştir (Ardic ve ark, 2005).

Stafilokoklarda tetrasiklin direncinin meydana gelmesinde iki temel mekanizma etkili olmaktadır. İlk mekanizmada plazmid kaynaklı *tet*(K) ve *tet*(L) genleri tarafından oluşturulan aktif refluks etkiliyken diğer mekanizmada ribozomal koruma olarak adlandırılan ve transpozon veya koromozomal olarak yerleşim gösteren *tet*(M)-*tet*(O) etkilidir. Çoğu *tet*(M) pozitif izolatlar ayrıca *tet*(K) içermektedir ve MRSA izolatları *tet*(M), *tet*(K) genotiplerine sahip oldukları için ribozomal koruma ve aktif refluks *S. aureus*'ta in vitro olarak indüklenebilir (Trzcinski ve ark., 2000; Ardic ve ark., 2005).

1.5.5. Kinolon Direnci

Flokinolonlar 1980'li yıllarda gram negatif bakterilerden kaynaklanan infeksiyonlara karşı tedavi amaçlı geliştirilmiştir. Ancak gram pozitif bakterilere karşı olan spektrumundan dolayı pnömokok ve stafilokok infeksiyonlarında da tedavi amaçlı kullanım alanı bulmuştur. *S. aureus*'ta kinolonlara karşı şekillenen direnç hızlı bir şekilde ortaya çıkmış ve yayılmıştır (Lowy, 2003).

Kinolonlar, DNA replikasyonunda rol oynayan DNA giraz ve topiozomeraz IV enzimlerini inhibe ederek direnç oluşumunda etkili olmaktadır. Direnç oluşumu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (McCallum ve ark., 2010; Lowy, 2003).

1.6. Stafilokokal Gıda Zehirlenmelerinde Patogenez ve Semptomlar

S. aureus insanlar ve hayvanlarda birçok hastalığa neden olmaktadır. Bu hastalıklara follikülit, karbonkül, impetigo, mastitis, yara infeksiyonları, osteomyelit, toksik şok sendrom, haşlanmış deri sendromu, septisemi/endokardit, pnömoni, neonatal deri lezyonları örnek olarak verilebilir. Ayrıca gıda kaynaklı zehirlenmelerin oluşumunda da önemli rol oynar. *S. aureus*'un bu hastalıkları oluşturmasında etkili çeşitli virülens faktörleri,

I- Konakçı dokuya tutunmaya yarayan yüzey proteinleri.

II- Lökosidin, kinaz ve hyalorinidaz gibi dokularda yayılmasını sağlayan invazinler.

III- Kapsül ve Protein A gibi fagositik aktiviteyi inhibe eden yüzey faktörleri.

IV- Karotenoid, katalaz gibi fagositler içerisinde canlılığını sürdürmesini sağlayan biyokimyasal faktörler.

V- Protein A, koagulaz gibi immünolojik etkenler.

VI- Hücre membranına zarar veren hemolizin, lökotoksin ve lökosidin gibi toksinler.

VII- Konakçı dokuya zarar vererek hastalığa ilişkin semptomların ortaya çıkmasına sebep olan SEA-G, TSST, ET gibi ekzotoksinler.

VIII- Antimikrobiyel ajanlara karşı oluşturulan direnç şeklinde sıralanabilir (Todar, 2005; Schneewind ve Missiakas, 2009).

Stafilokokal hücre duvarı lizozime dirençli ancak lizostafine duyarlıdır. Bazı *S. aureus* türleri toksin üretme yeteneğine sahiptir. Bu toksinler stafilokokal enterotoksin olarak adlandırılır ve stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olur. Gıda zehirlenmesi oluşturabilen, *C. perfringens, C. botulinum* ve *B. cereus* spor oluşturabilmesine rağmen *S. aureus* spor oluşturmaz. Bu yüzden gıdalara uygulanan ısı işlemi *S. aureus* kontaminasyonundan korunmak için etkili bir yöntemdir (Le Loir ve ark., 2003).

Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde semptomların oluşumu hızlıdır ve genellikle gıdanın alınmasından sonra 1-6 saat içerisinde şekillenmektedir. Semptomların oluşumunda alınan toksin miktarı ve bireysel duyarlılık etkilidir. En sık rastlanan semptomlar; mide bulantısı, kusma, abdominal kramp, öğürme ve ishaldir. Kusma en fazla görülen semtomdur. Şiddetli olgularda baş ağrısı, kas krampları ve bitkinlik meydana gelebilir. Çoğu olguda iyileşme hızlı ve ortalama 1 gün içerisinde şekillenmektedir. Mortalite oranı düşüktür, ancak bazen ölümle sonuçlanan olaylara rastalanabilir. Bu olgular genellikle yaşlı veya genç, immun sistemi baskılanmış bireylerdir. Stafilokokal gıda zehirlenmelerinde oluşan semptomlar ile ilgili 2 292 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada bu bireylerde % 82 oranında kusma, % 74 oranında mide bulantısı, % 68 oranında ishal ve % 64 oranında abdominal ağrı semptomlarına rastlanmıştır (Bergdoll ve Wong, 2006; Seo ve Bohach, 2007).

Yapılan çalışmalar enterotoksijenik özellikteki bir *S. aureus*'un gıdada toksin oluşturabilmesi için en az 10^5 kob/g oranında bulunması gerektiğini göstermiştir. Semptomların oluşması için 1 µg toksin yeterli olmaktadır. SE'ler kuvetli nörotoksinlerdir ve abdominal viserada bulunan hücresel reseptörleri uyararak beyinde kusma merkezine iletilen sinyaller ile kusma refleksini başlatır. Gastrointestinal semptomların oluşumunda ise yangısal mediyatörler (histamin, lökotrien) etkilidir. Mast hücre reseptörlerine SE'lerin bağlanması ile mast hücrelerinin aktive oldukları saptanmıştır (Le Loir ve ark., 2003; Lowy, 2003; Seo ve Bohach, 2007; Adams ve Moss, 2008).

1.7. *S. aureus*'un Gıdalarda Varlığı

*S. auereus'*un gıdalarda az miktarda bulunması önemli değildir. *S. aureus* deri florasında doğal olarak bulunduğu için piliç etinde ve diğer çiğ etlerde de bulunabilmektedir. Aynı şekilde mastitise bağlı olarak veya meme hijyeni yetersizliğinden dolayı çiğ sütte de bulunabilir. Pastörizasyon ve gıdalara ugulanan ısı işlemi ile birlikte genellikle bu bakteriler inaktive olmaktadır. Stafilokokal gıda intoksikasyonlarından sorumlu tutulan gıdalar arasında; proteince zengin ve işlem görmüş sığır, domuz, kanatlı etleri ve et ürünleri (pastırma, sucuk), salatalar, süt ve süt ürünleri, krema ve pastacılık ürünleri yer almaktadır. Özellikle sandviç gibi hazır gıdaların hazırlama aşamasında kontamine edilmesi stafilokokların gelişmesine ve toksin oluşturmasına sebep olabilmektedir. Özellikle subklinik mastitisli hayvanların sütlerinin normal sütlere karışıtırılması çiğ süt kontaminasyonunda etkilidir (Erol, 2007; Adams ve Moss, 2008).

Gıda işletmelerinde çalışan insanlar gıdaların kontaminasyonunda etkili bireylerdir. İnsanların burun ve ağız florasında normal olarak bulunması sebebiyle öksürme ve hapşırma ile *S. aureus* kontaminasyonu şekillenebilmektedir. Ayrıca infekte deri lezyonları kontaminasyonda etkili olabilir (Bergdoll ve Wong, 2006).

Ülkelerin tüketim alışkanlıklarına bağlı olarak meydana gelen stafilokok infeksiyonları farklılık gösterebilmektedir. Japonya'da Haziran - Temmuz 2000 yılında 13 420 kişi süt tozu sebebiyle hastalanmıştır. Semptomlar 6 saat içerisinde meydana gelmiş ve % 73,3 oranında kusma, % 75,9 oranında ishal vakaları görülmüştür. Etiyolojik etken olarak enterotoksijenik bir *S. aureus* ve toksin tipi olarak SEA izole edilmiştir (Jay ve ark. 2005).

İngiltere'de 1969-1990 yılları arasında stafilokokal gıda zehirlenmelerinin % 53'ünün kontamine et ürünleri (jambon), % 22'sinin kanatlı eti, % 8'inin süt ürünleri, % 7'sinin balık ve kabuklu deniz ürünleri ve % 3,5'inin ise yumurta tüketimi sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir. Fransa'da 1999-2000 yılları arasında meydana gelen stafilokokal intoksikasyonların % 32'sinden süt ürünleri (peynir), % 22'sinden et, % 15'inden sosis-sucuk gibi et ürünleri ile turtalar, % 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 yıları arasındaki 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).

1.7.1. Et ve Et Ürünlerinde *S. aureus* Varlığı

Di Giannatale ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada taze etlerde (kıyma ve piliç eti) *S. aureus* varlığını % 19,3 olarak tespit etmiştir. Et ürünlerinde yapılan bir çalışmada ise bu oran % 10 olarak bulunmuştur (Normanno ve ark., 2007a). Toplam 176 adet et örneği (42 piliç, 68 sığır eti, 66 domuz eti) ile yapılan diğer bir çalışmada ise *S. aureus* oranı, % 23, 8 olarak saptanmıştır (Pesavento ve ark., 2007). Çiğ piliç eti örnekleri üzerinde yapılan çalışmada, *S. aureus* varlığı % 65,8 olarak bulunmuştur (Kitai ve ark., 2005). Toplam 694 adet çiğ kıyma örneğinin kullanıldığı diğer bir çalışmada *S. aureus* varlığı, % 29 olarak tespit edilmiştir (Kelman ve ark., 2011). Pu ve ark., (2009) toplam 120 adet et örneğinde (sığır ve domuz eti) *S. aureus* varlığını % 39,2 olarak bulmuştur. Çalışmalar, et ve et ürünlerinde önemli oranda *S. aureus* varlığını göstermektedir.

1.7.2. Süt ve Süt Ürünlerinde *S. aureus* Varlığı

Bendahou ve ark. (2009), toplam 81 adet süt ve süt ürünü örneğinin 46'sında koagulaz pozitif stafilokok tespiti yapmıştır. Ertaş ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada ise; 150 adet süt ve süt ürününde (50 süt tatlısı, 100 koyun sütü) koagulaz pozitif stafilokok oranı, % 57,3 (86) olarak bulunmuştur. *S. aureus* varlığı süt tatlısında % 60 (60), koyun sütünde % 52 (26) şeklinde tespit edilmiştir. Kav ve ark., (2011) 127 adet Urfa peynirinin % 41,7'sinin *S. aureus* ile kontamine olduğunu bulmuştur. Gündoğan ve ark., (2006) çiğ süt, pastörüze süt ve dondurma olmak üzere toplam 180 örnek ile yaptıkları çalışmada; çiğ sütte % 100, pastörize sütte % 56,6, dondurmada ise % 26,6 oranında *S. aureus* saptamışlardır. Subklinik mastitis yönünden incelenen 480 adet örnekten, 106 *S. aureus* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların % 25,5'nin ise enterotoksijenik olduğu belirlenmiştir (Boynukara ve ark., 2008). Örnek olarak keçi sütü peynirinin kullanıldığı bir çalışmada ise 181 örneğin 14'ü (% 7,7), *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur (Akineden ve ark., 2008). Çiğ süt, beyaz peynir, kaşar peyniri tereyağ ve dondurma olmak üzere toplam 122

örneğin incelendiği bir çalışmada; 64 örnek (çiğ süt, % 75; beyaz peynir, % 37,5; kaşar peyniri, % 30; terayağ, % 30; dondurma, % 10), *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur (Gücükoğlu ve ark., 2012). Koyun ve inek sütü kullanarak yapılan taze peynirlerde *S. aureus* varlığı % 13,3 şeklinde tespit edilmiştir (Di Giannatale ve ark., 2011). Normanno ve ark., (2007a) tarafından süt ürünlerinde *S. aureus* varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada oranı % 17 olarak bulmuştur. Süt ve süt ürünlerinin de önemli bir *S. aureus* kaynağı olabileceği bu şekilde gösterilmiştir.

1.7.3. Diğer Gıdalarda *S. aureus* Varlığı

Di Giannatale ve ark., (2011) çeşitli gıdalar üzerinde yaptıkları çalışmada *S. aureus* varlığını pastacılık ürünlerinde; % 3,6, mezelerde % 7,7, midyede % 6,0 olarak bulmuştur. Aynı şekilde farklı gıdaların bulunduğu toplam 11 384 örneğin % 17,3'ünde koagulaz pozitif stafilokok tespit edilmiştir (Normanno ve ark., 2005). Shahraz ve ark., (2012) tarafından toplam 256 adet paketlenmiş hamburgerde *S. aureus* varlığı araştırılmıştır ve bu oran % 25 olarak tespit edilmiştir.

1.8. Sığır Karkaslarından Örnek Alma Yöntemleri

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğine göre numune alma ve analiz numunesinin hazırlanması için özel bir kural yoksa ISO ve Codex Alimentarius'un ilgili kılavuzu referens metot olarak kullanılabileceği bildirilmektedir. Sığır, domuz, koyun, keçi ve at karkaslarından numune alırken numune alınacak kısmın seçimi, depolanması ve taşınması ile ilgili kurallar ise ISO 17604'de tanımlanmaktadır. ISO 17604'e göre sünger swap yöntemi karkas örneklemesi amacıyla kullanılabilmektedir. *Enterobacteriaceae* ve aerobik koloni sayımı için her bir karkasın dört farklı kasından örnek alınmalıdır. *Salmonella spp.* analizi için ise kazıma sünger metodu tercih edilmelidir ve bulaşmanın en yoğun olduğu bölgeden en az 400 cm^2'lik bir alanı kapsayacak şekilde numune alınmalıdır (Anon., 2011).

Örnek almak amacıyla kullanılan yöntemlerden sünger swap ve eksizyon yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada, eksizyon yönteminin sünger swap

yöntemine göre bakterilerin izole edilmesi bakımından daha etkili olduğu belirtilmiştir. Ancak eksizyon yönteminin yanında sünger swap yönteminin de bakterilerin tespiti açısından önemli olduğu bildirilmiştir. (Ware ve ark., 1999; Miraglia ve ark., 2005). Sığır, koyun ve domuz karkaslarında örnek alma yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; swap ve eksizyon yönteminin avantajları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak karkas üzerinde olumsuz etkisinin bulunmamasından dolayı et endüstrisinde swap ile örnek alma yönteminin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Pepperell ve ark., 2005).

1.9. Epidemiyoloji

S. aureus ve *S. epidermidis* insanda potansiyel patojen olarak her zaman bulunabilir. *S. haemolyticus, S. simulans, S. cohnii, S. warneri* ve *S. lugdunensis* insanda bulunup patojen olabilen diğer türler olarak nitelendirilebilir. İnsan derisinde kolonize olabildikleri için stafilokokal türler tüm antibiyotik türlerine maruz kalabilir. *S. aureus* hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenidir. Aynı zamanda ortaya çıkan antibiyotik direnci dünya çapında insanlar arasında MRSA ve VRSA tiplerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Schneewind ve Missiakas, 2009).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, hem bireysel hem de salgınlar oluşturarak birçok insanı etkilemektedir. Bu zehirlenmeler genellikle yumuşak seyirli olduğu için diğer gıda zehirlenmeleri kadar veri elde edilememektedir. Bildirilen vakalar daha çok salgınlar şeklinde olup, birkaç vakanın sporadik özellik taşıdı anlaşılmıştır. Salgınlar farklı gıdalardan kaynaklanabilmektedir (Çizelge 1.4.). Amerika'da toplam gıda zehirlenmeleri arasında; stafilokoklardan kaynaklanan gıda zehirlenmeleri oranı % 14 olarak tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalara göre stafilokokal gıda zehirlenmeri yılda 1,5 milyon olgu ve 1 210 ölüme neden olup 1,2 milyar dolar ekonomik maliyet oluşturmaktadır (Seo ve Bohach, 2007).

Amerika'da 1983 ve 1987 yılları arasında ise stafilokokal gıda zehirlenmesi oranı % 7,8 olarak gerçekleşmiştir. Aynı dönemde İngiltere'de meydana gelen olguların % 1,9'unun stafilokokal intoksikasyonlardan kaynaklandığı rapor edilmiştir (Adams ve Moss, 2008).

Amerika'da 1998-2008 yılları arasında *B. cereus, C. perfringens* ve *S. aureus* kaynaklı 1 229 gıda kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Rapor edilen salgınlardan % 39'u etiyolojik olarak doğrulanmıştır. Kusma olgularında etkili patojenler, olguların % 87'sinde *S. aureus,* % 75'inde *B.cereus,* % 9'unda ise *C. perfringens* olarak bulunmuştur. Et ve piliç gibi gıdaların kontaminasyonunda *C. perfringens*'in % 63 ve *S. aureus*'un % 55, pirinç kontaminasyonunda ise *B. cereus*'un % 50 oranında etkili olduğu tespit edilmiştir. Gıda hazırlama ve işlemelerinden kaynaklanan hatalar kontaminasyonda % 93 oranında etkili olmuştur. Gıda hazırlayan kişilerden kaynaklanan kontaminasyonda *S. aureus,* % 55 ile oldukça yaygın bir oranda bulunmuştur (Bennett ve ark., 2013).

Çizelge 1.4. CDC tarafından rapor edilen 573 stafilokokal gıda zehirlenmesi salgını 1998–2010 (Doyle ve ark., 2012).

Gıda Kaynağı	**Salgın sayısı (%)**
Et (Toplam)	276 (48,2)
Sığır eti	54 (9,4)
Piliç eti	87 (15,2)
Jambon	39 (6,8)
Domuz eti	48 (8,4)
Hindi eti	19 (3,3)
Kurutulmuş et	11 (1,9)
Diğer et	19 (3,3)
Deniz ürünleri	37 (6,5)
Salata	36 (6,3)
Patates	30 (5,2)
Pirinç	28 (4,9)
Süt ürünleri	12 (2,1)
Sos	7 (1,2)
Yumurta	8 (1,4)
Kombine gıdalar	42 (7,3)
Farklı gıdalar	13 (2,3)
Bilinmeyen	104 (18,1)

Çin'de 2008-2010 yılları arasında meydana gelen 371 gıda kaynaklı salgında, 20 062 kişi etkilenmiş ve 41 kişi ölmüştür. 2003-2007 yılları arasında meydana gelen 94 salgın stafilokokal gıda zehirlenmesi kaynaklıdır ve 2 223 kişi etkilenerek 1 186 kişi yatarak tedavi altına alınmıştır *S. aureus; V. Parahaemolyticus, B.cereus, B. proteus* ve *Salmonella'dan* sonra beşinci sık rastlanan patojen olarak tespit edilmiştir. Shenzhen bölgesinde, 2006-2009 yılları arasında rastlanan 11 stafilokokal gıda

zehirlenme kaynaklı salgın, *V. parahaemolyticus*'dan sonra en sık rastlanan salgın olmuştur (Yan ve ark., 2012; Mao ve ark., 2010).

Japonya'da 2000 yılında stafilokokal gıda intoksikasyonuna bağlı olarak büyük bir salgın meydana gelmiştir. Etkilenen 13 420 kişinin kontamine süt ürünleri tüketimi sonucu hastalandığı tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar, süt ürünlerinin kontaminasyonundan yağsız süt tozunun sorumlu olduğunu göstermiştir. Yağsız süt tozunda yaklaşık 3,7 ng/g SEA tespit edilmiştir. Tahmini alınan toksin miktarının 20-100 ng arasında olduğu belirtilmiştir. Yağsız süt tozunun üretimi sırasında 130 ºC ısı işlemi uygulanmasına rağmen, SEA aktivitesini korumuştur (Asao ve ark., 2003).

Avusturya'da 2007 yılında okullarda meydana gelen ve 1 025 çocuğun etkilendiği 166 olgu meydana gelmiştir. Aynı işletmede bulunan ineklerden elde edilen pastörize süt, vanilyalı - kakaolu süt, yoğurt gibi ürünlerin okullara dağıtılmasından sonra abdominal kramp, kusma ve halsizlik semptomları meydana gelmiştir. Semptomların tespitinden sonra sabah yapılan süt dağıtımı öğleden sonra durdurulmuştur. Alınan örneklerden yapılan incelemeler sonucunda salgına enterotoksijenik karakterde *S. aureus*'un neden olduğu anlaşılmıştır (Schmid ve ark., 2009).

Fransa'da Ekim-Kasım 2009 tarihleri arasında 6 gıda kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Salgınlardan pastörize edilmemiş sütten yapılan yumuşak bir peynir sorumlu tutulmuştur. Peyniri tüketen 26 kişiden 23'ünde mide bulantısı, kusma, ishal ve abdominal kramp semptomları ile bazı olgularda ateş meydana gelmiştir. Şüpheli örneklerden yapılan inceleme ile koagulaz pozitif stafilokok örneklerinden yapılan PCR işlemi sonucunda *S. aureus* ve *see* geni tespit edilmiştir. Salgından sorumlu toksin SEE olarak bulunmuştur (Ostyn ve ark., 2010).

Kore'de 1981-1995 yılları arasında 64 stafilokokal gıda zehirlenmesi, 2 430 olgu kaydedilmiştir. Tüm gıda kaynaklı zehirlenmeler arasında stafilokokal gıda zehirlenmelerinin oranı % 16,5 olarak bulunmuştur. Japonya'da aynı periyotta bu oran % 9,9 - % 15,9 arasında değişmiştir. Japonya'da 1980 - 1999 yılları arasında 2 525 salgın meydana gelmiş ve 59 964 kişi bu salgınlardın etkilenerek 3 kişi hayatını kaybetmiştir. Sorumlu gıdalar ise pirinç, pirinç topları ve soya peyniri olarak tespit edilmiştir. SEA - SEB sorumlu toksinler olarak tespit edilmiştir (Jay ve ark., 2005).

Avustralya'da 2000 yılında meydana gelen bir salgında 50 kişide soğuk piliç eti, salata ve tatlı tüketiminden 5 saat sonra kusma, diyare ve karın ağrısı gözlenmiştir. Dışkı ve kusmuk örneklerinin incelenmesi sonucunda stailokokal enterotoksin tespit edilmiştir. Şüpheli gıda örneklerinin incelenmesi sonucunda ise koagulaz pozitif stafilokok bulunmuştur. Ayrıca örneklerden piliç etinde; stafilokokal enterotoksin tespit edilmiştir. Moleküler düzeyde yapılan incelemeler, insan ve gıda örneklerinden elde edilen stafilokok izolatları arasında genetik yakınlık olduğunu göstermiştir. Gıda ile temas halinde olan kişilerin çiğ ve pişmiş piliç eti arasında çapraz kontaminasyon oluşturmaları ve piliç etinin pişirildikten sonra uygun olmayan muhafazası sonucu bakteriyel gelişimin hızlanarak salgında etkili olduğu bildirilmiştir (Cowell ve ark., 2002).

Kuveyt'te bulunan resteronlarda çalışan ve gıda hazırlama işi ile uğraşan kişilerden alınan svap örnekleri ile *S. aureus* ve koagulaz negatif stafilokokların varlığı yönünden bir araştırma yapılmıştır. Kişilerin el ve burun mukozasından alınan örneklerden 32 *S. aureus* ve 142 koagulaz negatif stafilokok olmak üzere toplam 174 stafilokok izole edilmiştir. *S. aureus'*un % 12,5, koagulaz negatif stafilokokların % 8 düzeyinde SEA, SEB ve SEC'yi tek başına ya da kombine olarak sentezledikleri görülmüştür. İzolatlarda en çok sentezlenen toksin SEB olarak bulunmuştur. TSST-1 ise izolatlarda % 7 oranında tespit edilmiştir. Bu çalışma *S. aureus* dışında, bazı koagulaz negatif izolatlarında enterotoksin üretme yeteneğine sahip olduğunun gösterilmesi açısından önemlidir (Udo ve ark., 2009).

Almanya'da 2008 yılında 150 kişinin katıldığı bir düğün organizasyonunda, tavuklu krep tüketen kişilerde 3 saat sonra akut gastroenteritis, ateş, kusma, ishal gibi semptomlar meydana gelmiştir. Hastalanan 12 kişiden 9'u hastaneye kaldırılmıştır. Hastanede yatarak tedavi altına alınan 4 kişi içerisinde 2 yaşında bir çocuk ve hamile bir kadının olması da dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır. Hastalardan ve gıda hazırlayan kişilerden alınan svap örnekleri ile tüketilen şüpheli gıdalardan alınan örneklerin incelenmesi sonucunda aynı serotipin hastalığa neden olduğu anlaşılmıştır. Sorumlu toksinler ise SEA, TSST-1 olarak bulunmuştur. Bu çalışma kaynağından izolasyon ile tespit edilen stafilokokal gıda zehirlenmeleri açısından önemli olarak değerlendirilmektedir (Johler ve ark., 2013).

Brezilya'da 1999 yılında Şubat ve Mayıs aylarında iki ayrı gıda kaynaklı salgın meydana gelmiştir. Bu salgınlardan toplam 378 kişi etkilenmiştir. İlk salgından etkilenen kişi sayısı 50'dir ve kontamine peynirin tüketilmesinden 2 saat sonra intoksikasyona ilişkin semptomlar (kusma, ishal, baş ağrısı, titreme, baş dönmesi) ortaya çıkmıştır. İkinci salgında ise çiğ süt tüketiminin ardından 328 kişide kusma ve ishal semptomları ortaya çıkmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda peynirde SEA, SEB, SEC toksinleri üretme yeteneğine sahip enterotoksijenik karakterde *S. aureus* saptanmıştır. Çiğ sütte ise SEC ve SED toksinleri ile koagulaz negatif stafilokok saptanmıştır. Sonuç olarak peynirin gıda ile teması olan kişiler tarafından kontamine edildiği ve çiğ sütün kontaminasyonunda ise mastitisin etkili olduğu bildirilmiştir (Do Carmo ve ark., 2002).

Hindistan'da 2005 yılında yapılan ve geleneksel yoğurtlu bir yiyecek olan "Bhalla" kaynaklı bir salgın meydana gelmiştir. Etkilenen 100'den fazla çocuk ve yetişkin, tipik stafilokokal gıda zehirlenmesi semptomları göstermiştir. Alınan gıda ve klinik örnekler sonucunda etken, enterotoksijenik bir *S. aureus* olarak belirlenmiştir. İzolatların SEB, SED toksinleri üretme yeteneklerine sahip oldukları ve oksasilin, vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları saptanmıştır (Nema ve ark., 2007).

1.10. Gıdalarda MRSA Varlığı ve Potansiyel Riskler

Genel populasyonun yaklaşık % 50'si *S. aureus* taşıyıcısı olarak rol oynarken, CDC'ye göre populasyonun sadece % 1,5'i MRSA taşıyıcısıdır. Ancak yaşlı insanlarda bu oran daha da fazla olabilmektedir. MRSA taşıyan hayvanlarla uğraşan kişiler ve mesleklerde de MRSA taşıma riski artmaktadır (Doyle, 2012).

MRSA'ya dünya çapında; çiğ et (domuz, piliç, sığır) ve çiğ sütte rastlanmıştır. Bazı olaylarda gıda hazırlayan kişiler de MRSA olgularına kaynak teşkil etmiştir (Pu ve ark., 2009; Hata ve ark., 2010; Türkyılmaz ve ark., 2010; Weese ve ark., 2010). MRSA ile ilgili infeksiyonlar ABD'de 30 yıldan beri rapor edilmektedir. Önceden sadece hastane kaynaklı infeksiyonlar problem teşkil etmekteyken günümüzde toplumsal kaynaklı ve gıda kaynaklı infeksiyonlar da oluşmuştur (Jones ve ark., 2002).

ABD'de 2002 yılında toplum kaynaklı bir MRSA salgını meydana gelmiştir. Marketten satın alınan domuz barbeküsünün aile bireyleri tarafından tüketilmesini takiben 3-4 saat içerisinde bulantı, kusma ve karın krampları meydana gelmiştir. Market personeli, hastalanan bireyler ve şüpheli gıdalardan alınan örnekler sonucunda 12 *S. aureus* izolatı elde edilmiştir. Elde edilen izolatların 3'ü infekte bireylerden, 3'ü domuz barbeküsünden, 1'i lahana salatası ve 5'i market personelinden izole edilmiştir. İzolatların 5'inin metisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Salgından MRSA taşıyıcı market personeli sorumlu tutulmuştur. Bu kişinin lahana salatası ve domuz barbeküsünü hazırlayan personel olduğu ve kontaminasyon öncesi stafilokokal infeksiyondan ölen akrabasını hastanede ziyaret ettiği anlaşılmıştır. Bu personelin nasal svap örneğinden izole edilen MRSA'nın SEC'yi sentezlediği de saptanmıştır (Jones ve ark., 2002).

Kore'de 2003-2006 yıllarını kapsayan bir çalışmada farklı gıdalardan 165 *S. aureus* izolatı elde edilmiştir. İzolatlardan 150'sinin en az bir antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilmiş ve vankomisine dirençli izolat bulunamamıştır. İzolatlardan 4'ünün oksasilin ve sefoksitin antibiyotiklerine dirençli oldukları ve *mecA* geni taşıdıkları saptanmıştır. *mecA* pozitif MRSA izolatlarının çiğ et ve balık eti örneklerinde bulundukları bildirilmiştir (Rhee ve Woo, 2010).

İtalya'da 2003-2005 yıllarını kapsayan bir çalışmada 1 634 hayvansal kaynaklı gıda (süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri) örneği incelenmiştir ve 160 *S. aureus* izolatı elde edilmiştir. İzolatlardan 6'sı (% 3,75) *mecA* pozitif olarak tespit edilmiştir. *mecA* pozitif izolatlardan 4'ü inek sütünden, 2'si ise peynirden olmak üzere 6 farklı örnekten elde edilmiştir. MRSA izolatlarının hepsinin enterotoksijenik oldukları bildirilmiştir (Normanno ve ark., 2007b).

Hollanda'da Haziran 2007-Mayıs 2008 yıllarını kapsayan bir çalışmada 2 217 çiğ sığır, domuz, dana, koyun/kuzu, piliç, hindi, kümes ve av hayvanı eti örnek olarak kullanılmıştır. Örneklerden 264'ü (% 11,9) MRSA pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sığır eti % 10,6, domuz eti % 10,7, dana eti % 15,2, koyun/kuzu eti % 6,2, piliç eti % 16, hindi eti % 35,3, kümes hayvanı eti %3,4, av hayvanı eti % 2,2 olarak tespit edilmiştir (De Boer ve ark., 2009).

Amerika'da Şubat-Mart 2008 tarihlerini kapsayan bir çalşmada 120 perakende et (90 domuz eti, 30 sığır eti) örneği incelenmiştir. İncelenen 47 et

örneğinden 121 *S. aureus* izolatı elde edilmiştir. *S. aureus*'un domuz etinde % 45,6, sığır etinde % 20 oranında varlığı tespit edilmiştir. MRSA ise 6 et örneğinden (5 domuz eti, 1 sığır eti) izole edilmiş ve domuz etinde % 5,6, sığır etinde % 3,3 oranında bulunmuştur (Pu ve ark., 2009).

Amerika'nın Michigan eyaleti Detroit şehrinde, Ağustos 2009-Ocak 2010 tarihleri arasında yapılan çalışmada; 289 çiğ et örneği (156 sığır eti, 76 piliç eti, 57 hindi eti) kullanılmıştır. Örneklerden 65 (% 22,5) izolat elde edilmiştir. İzolatların 32'sinin sığır (% 20,5), 19'unun piliç (% 25,0) ve 14'ünün hindi (% 24,6) orjinli olduğu saptanmıştır. Örneklerin 6'sı MRSA pozitif olarak bulunmuştur. MRSA pozitif örnekler; 2 sığır (% 1,3), 3 piliç (% 3,9) ve 1 hindi (% 1,7) olarak tespit edilmiştir. MRSA doğrulanması *mecA* geni tespiti ile yapılmıştır. Amerika'da yapılan diğer çalışmalara göre bu çalışmada *S. aureus* ve MRSA oranının az olarak bulunması domuz eti ve domuzun önemli bir MRSA kaynağı olmasına bağlanmıştır (Bhargava ve ark., 2011).

Hong Kong'da marketlerden donmuş ve taze alınan 1 400 et örneği MRSA varlığı yönünden incelenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda % 21,9 oranında domuz eti (78/355), % 6,8 oranında piliç (31/455) ve % 4,4 oranında sığır eti (17/380) MRSA yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir. Taze domuz eti (% 47) donmuş (% 0,6) olana göre daha kontamine bulunurken, piliç etinde taze (% 6) ve donmuşa göre (% 7) benzer oranda kontaminasyon bulunmuştur. MRSA'nın et kontaminasyonunda etkili olması sebebiyle, gıda güvenliği ve personel hijyeni kurallarını eksiksiz uygulamanın halk sağlığı açısından toplumda MRSA riskini azaltacağı sonucuna varılmıştır (Boost ve ark., 2013).

Amerika'nın Georgia eyaletinde yapılan bir çalışmada 100 domuz eti örneği, 100 sığır eti örneği ve 100 insan *S. aureus* izolatı MRSA yönünden incelenmiştir. Çalışma sonucunda; % 45 oranında (45/100) domuz eti, % 63 oranında (63/100) sığır eti *S. aureus* pozitif olarak değerlendirilmiştir. *mecA* pozitif *S. aureus* domuz etinde % 3 (3/100), sığır etinde % 4 (4/100) olarak bulunmuştur. İnsan izolatlarında bu oran % 50 (50/100) olarak değerlendirilmiştir. Tüm kaynaklardan elde edilen MRSA izolatlarında çoklu antibiyotik direncine rastlanmıştır. MRSA izolatlarının insan izolatları ile akrabalık dereceleri PFGE ile değerlendirilmiştir (Jackson ve ark., 2013).

Çizelge 1.5. Rapor edilen MRSA olguları (Doyle ve ark., 2012).

Gıda	Olgu sayısı	Pozitif oran %	Ülke
Sığır eti	8	1.0-10.6	Amerika, Kanada, Danimarka, İran, Japonya, Kore, Hollanda
Dana eti	3	2.2-15.2	İspanya ve Hollanda
Domuz eti	15	0.04-50	Amerika, Kanda, Danimarka, Almanya, Japonya, Tayland, Hollanda, Polonya, İspanya
Domuz eti,	1	25	İspanya
yabani koyun	1	6.2	Hollanda
eti, piliç	12	0.7-43.8	Amerika, Kanada, Çin, Almanya, Japonya, İspanya, Hollanda, Türkiye
Hindi eti	3	35.3-51	Amerika, Almanya, Hollanda
Ördek eti	1	50	Japonya
Tavşan eti	1	12.5	İspanya
Balık	2	2.5-20	Japonya, Kore
İnek sütü	5	1.3-17.6	Amerika, Belçika, Brezilya, Hindistan, İsviçre
Keçi sütü	1	3.5	İran
Manda sütü	1	2.5	Türkiye
Lahana	1	1.8	Kore

1.11. Korunma ve Kontrol

S. aureus başta insanlar olmak üzere hayvanların deri, burun mukozaları, boğaz mukozaları ile apse içeriklerinde ve çevrede yaygın olarak bulunur. Nitekim sağlıklı insanların burun ve boğaz mukozasında % 20 düzeyinde *S. aureus* izole edildiği bildirilmektedir. Dolayısıyla başta et ve et ürünleri olmak üzere, tüm gıdalarda *S. aureus*'un gıda maddelerine bulaşmasında personelin önemli düzeyde etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle gıda işletmelerinde personel hijyenine gerekli önem verilmelidir. Stafilokokal gıda zehirlenmelerinden korunmak amacıyla aşağıda belirtilen pratik önlemler alınmalıdır.

1- Kesimhanelerde kesim öncesi hayvanların temizliğine dikkat edilmeli, aşırı kirli hayvanların kesimhaneye girişine müsaade edilmemelidir.

2- Kesimhanelerde kesim işleminin tüm aşamalarında başta kesim hijyeni olmak üzere alet, ekipman ile personel hijyenine yönelik gerekli önlemler alınmalıdır.

3- Aynı şekilde kesim sonrası parçalama ve etin işlenmesi aşamalarında hijyenik önlemler alınmalıdır.

4- Muhafaza koşullarına dikkat edilmeli ve Stafilokokların gıdalarda üremesini önlemek amacıyla 4.4ºC'nin altında tutulmalı.
5- Gıda işletmelerinde uygulanan HACCP ve GMP sistemlerinin uygunlukları etkin olarak kontrol edilmelidir (Adams ve Moss, 2008).

Bu tez çalışmasında; a) Sığır karkaslarından sünger swap yöntemiyle alınacak örneklerde *S. aureus*'un klasik yöntemle izolasyon ve identifikasyonu, b) İzolatların PCR tekniği ile doğrulanması, c) Doğrulanan *S. aureus* izolatlarının enterotoksin ve *mecA* genlerinin PCR yöntemi ile saptanması, d) İzolatların antimikrobiyal direnç özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

Bu çalışmada, Haziran 2011 ve Mayıs 2012 tarihleri arasında Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahada kesilen, 120 adet sığır karkasından alınan örnekler gereç olarak kullanıldı.

Örneklerin alınması çalışma düzeni bakımından, aylara dağıtılmış ve yılın her ayında 10'ar adet örnek alınmıştır. Örneklerin alındığı mezbahalar Ankara'da bulunan 1'i kamuya, diğeri özel sektöre ait günlük 100-200 baş sığır kesim kapasitesine sahip kesimhanelerdir.

2.1.1. Mikrobiyolojik Analizlerde Kullanılan Besiyerleri ve Test Malzemeleri

Peptone Water (Oxoid CM0009)

Hazır besiyerinden 15 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü ve pH-değeri 7,2±0,2'ye ayarlandı. Daha sonra bir kısmı 16x150 mm'lik tüplere 9'ar ml paylaştırılarak, bir kısmı ise erlen-mayerlere aktarılarak 121 °C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi.

Baird-Parker Agar Base (Merck 1.05406)

Hazır besiyerinden 58 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü ve pH-değeri 6,8±0,2'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve üzerine 50 ml Egg Yolk Tellürite Emulsion (Oxoid SR0054) ilave edilerek karıştırıldı. Besiyeri steril petrilere 12-13 ml miktarında dökülerek hazırlandı.

Egg-Yolk Tellurit Emulsion (Merck 1.03785)

Yumurta sarısı emülsiyonu olup potasyum tellürit içermektedir. Kullanıma hazır sıvı şekilde 50 ml'lik formdadır.

Brain Heart Infusion Broth (CM0225)

Hazır besiyerinden 37 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü ve pH-değeri 7,4±0,2'ye ayarlandıktan sonra 16x150 mm'lik tüplere aktarılarak 121^{o}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi.

Tryptone Soya Agar (Oxoid CM0131)

Hazır besiyerinden 40 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü ve pH-değeri 7,3±0,2'ye ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. Daha sonra 16x150 mm'lik tüplere aktarılarak 121^{o}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi ve tüpler laboratuvarda belirli eğimde tutularak yatık agar elde edildi.

Dnase Agar (Oxoid CM0321)

Hazır besiyerinden 39 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü ve pH-değeri 7,3±0,2'ye ayarlandıktan sonra, sıcak su banyosunda tamamen eritildi. Bunu takiben 121^{o}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra, 50^{o}C'ye kadar soğutuldu ve steril petrilere 12-13 ml miktarında dökülerek hazırlandı.

Phenol-Red Broth Base (Merck 1.10987)

Hazır besiyerinden 25 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözdürüldü ve 16x150 mm'lik tüplere aktarılarak, 121^{o}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildi. Hazırlanan sıvı besiyerleri 60°C'ye soğutulduktan sonra üzerlerine son konsantrasyon 5-10 g/lt olacak şekilde önceden sterilize edilmiş olan D (-) mannitol (Merck 5982) ilavesi yapıldı.

Columbia Blood Agar Base (Oxoid CM0331)

Hazır besiyerinden 39 g alınarak 1 litre distile suda çözdürüldü. Besiyerinin pH-değeri 7,3±0,2'e ayarlandıktan sonra, sıcak su banyosunda eritildi. Bunu takiben besi yeri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50°C'ye kadar soğutulup üzerine 70 ml (% 7) steril defibrine koyun kanı ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril petrilere dökülerek 4°C'de muhafaza edildi.

Lyophilized Coagulase Rabbit Plasma with EDTA (Merck 1.13306)

Bir pakette EDTA'lı liyofilize tavşan plazması içeren 6 adet şişe bulunmaktadır. Her bir şişe için 3 ml steril distile su kullanarak çözdürme işlemi yapıldı. Daha sonra rehidratize edilen bu plazmalar ile kültür süspansiyonu karıştırılarak tüpte koagulaz testi için kullanıldı.

Staphylase Test Kit (Oxoid DR0595)

Bağlı koagulaz (clumping factor) tipini tespit için hazır staphylase test kiti (Oxoid DR0595) kullanıldı.

2.1.2. PCR Analizlerinde Kullanılan Malzemeler

***Taq* DNA Polymerase (DZTQ-5)**

Bu enzim, 500 u (5 u/µl), 10X *Taq* Buffer ve 25 mM $MgCl_2$ solüsyonu ile beraber temin edildi.

dNTP Mix (DZ010-25)

Bu kimyasal, 1 ml (40 µmol total) ve 10 mM konsantrasyonda dATP, dTTP, dGTP, dCTP içeren karışım halinde temin edildi.

Ladder+Loading Buffer (BR306605)

Bu madde, 50 µg/250 µ konsantrasyonda olup 6x Brom fenol mavisi jel yükleme solüsyonu (DZBFB-10) ile beraber temin edildi.

Primerler

Çalışmada kullanılacak primerler, çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilen baz çiftleri dikkate alınarak sentezleri yaptırıldı (Alphaprm200).

Çizelge 2.1. Primerler.

Gen	Primer sekansı (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Referans
sea	Primer 1: GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG Primer 2: CGG CAC TTT TTT CTC TTC GG	102	Mehrotra ve ark. (2000)
seb	Primer 1: GTA TGG TGG TGT AAC TGA GC Primer 2: CCA AAT AGT GAC GAG TTA GG	164	Mehrotra ve ark. (2000)
sec	Primer 1: AGA TGA AGT AGT TGA TGT GTA TGG Primer 2: CAC ACT TTT AGA ATC AAC CG	451	Mehrotra ve ark. (2000)
sed	Primer 1: CCA ATA ATA GGA GAA AAT AAA AG Primer 2: ATT GGT ATT TTT TTT CGT TC	278	Mehrotra ve ark. (2000)
see	Primer 1: AGG TTT TTT CAC AGG TCA TCC Primer 2: CTT TTT TTT CTT CGG TCA ATC	209	Mehrotra ve ark. (2000)
seg	Primer 1: AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GAT C Primer 2: AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC	642	Jarraud ve ark. (1999)
seh	Primer 1: CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG Primer 2: CAT CTA CCC AAA CAT TAG CAC C	376	Jarraud ve ark. (1999)
sei	Primer 1: CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G Primer 2: AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCT C	577	Jarraud ve ark. (1999)
sej	Primer 1: CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG Primer 2: CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	142	Monday ve Bohach (1999)

Çizelge 2.1. Devam. Primerler.

tst	Primer 1: ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA Primer 2: TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	350	Johnson ve ark. (1991)
mecA	Primer 1: ACT GCT ATC CAC CCT CAA AC Primer 2: CTG GTG AAG TTG TAA TCT GG	163	Mehrotra ve ark. (2000)
16S rRNA	Primer 1: GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC Primer 2: CGC ACA TCA GCG TCA G	228	Monday ve Bohach (1999)
nuc	Primer 1: GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT Primer 2: AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	279	Brakstad ve ark. (1992)

Tris Borate EDTA Buffer (DZTBE10-1)

Bu kimyasal 10x TBE solüsyonundan 1x TBE olarak hazırlandı.

Ethidium Bromide (DZEB-10)

Bu kimyasal, 10 mg/ml olarak hazırlanan stok solüsyondan % 1,5-2'lik 100 ml agaroz jel için 5 µl kullanıldı.

Tris EDTA Buffer (DZTE1-05)

DNA izlolasyonu için 1x hacimde TE buffer solüsyonu kullanıldı.

Lysostaphin (Sigma, L7386-1MG, USA)

Hazır olarak temin edilen bu kimyasal (1 mg) 1 ml steril distile su içerisinde sulandırılarak, 1,2 U/µl'lik konsantrasyonu elde edildi. Bu karışımdan tek bir örnek için 9 U/µl hacimde kullanmak amacıyla 7,5 µl alındı.

Agaroz Jel

Hazır kimyasaldan % 2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 g agaroz (AXYGEN AGR-LE-1001) 100 ml 1x TBE ile sulandırıldı ve mikrodalga fırında eritildikten sonra üzerine 5 µl ethidium bromide ilave edilerek kullanıldı.

2.1.3. DNA İzolasyonu Amacıyla Kullanılan Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit Malzemeleri

Bu çalışmada, DNA izolasyonu amacıyla Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, 69506) kullanıldı. Bu izolasyon kitinde bulunan malzemeler aşağıda belirtildiği gibidir.

DNeasy Mini Spin Columns-2 ml Collection Tubes
Collection Tubes (2 ml)
Buffer ATL
Buffer AL
Buffer AW1
Buffer AW2
Buffer AE
Proteinase K

2.1.4. Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri

Mueller Hinton Agar (Oxoid CM0337)

Hazır besiyerinden 38 g alınarak 1 lt distile su içerisinde çözündürüldü ve pH-değeri 7,3±0,1'e ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda tamamen eritildi. Bunu takiben

121^{o}C'de 15 dk otoklavda sterilize edildikten sonra 50 ^{o}C'ye kadar soğutuldu ve besiyeri steril petrilere dökülerek hazırlandı.

Çizelge 2.2. Antibiyotik diskleri.

Antibiyotik	**Konsantrasyon (µg)**	**Firma**
Cefoxitin (FOX 30)	30	Oxoid CT0119B
Tetracycline (TE 30)	30	Oxoid CT0054B
Gentamicin (CN 10)	10	Oxoid CT0024B
Oxacillin (OX 1)	1	Oxoid CT0159B
Chloramphenicol (C 30)	30	Oxoid CT0013B
Vancomycin (VA 30)	30	Oxoid CT0058B
Ampicillin (AMP 10)	10	Oxoid CT0003B
Sulphamethoxazole Trimethoprim (SXT 25)	25	Oxoid CT0052B
Erythromycin (E 15)	15	Oxoid CT0020B

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Örneklerin Alınması

Örnekler, karkaslardan sünger swap tekniği ile alındı ve örnekleme tekniğinde USDA/FSIS'in önermiş olduğu yöntem kullanıldı (Anon., 1996). Bu amaçla farklı tarihlerde ziyaret edilen sığır kesimhanelerinde, yeni kesilmiş ve rastgele seçilmiş olan sığır karkaslarının steril bir şablon ile işaretlenen but, kavram ve döş bölgerinden 100 cm^2'lik (10x10) temsili alandan (toplam 300 cm^2) sünger swap tekniği ile örnekler alındı. Steril poşetler içerisinde bulunan sünger swaplar kullanmadan önce 10 ml peptonlu su ile sulandırıldı ve swabın bir yüzüyle karkasın 2 farklı bölgesinden, diğer yüzüyle karkasın diğer 3. bölgesinden (10'ar kez yatay ve dikey pozisyonda sürülerek) örnekler alındı. Alınan örnekler aseptik koşullarda ve soğuk zincir altında laboratuvara getirildi.

2.2.2. Mikrobiyolojik Analizler

Sığır karkaslarından alınan sünger swap örnekleri üzerine 15 ml peptonlu su ilave edilerek, 2 dk süreyle stomacherde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemini takiben, karışımdan 10^{-6}'ya kadar desimal dilüsyonlar hazırlanarak damla plak yöntemine göre mikrobiyolojik ekimleri yapıldı (Anon., 1996).

2.2.2.1. Mikrokok/Stafilokokların Saptanması

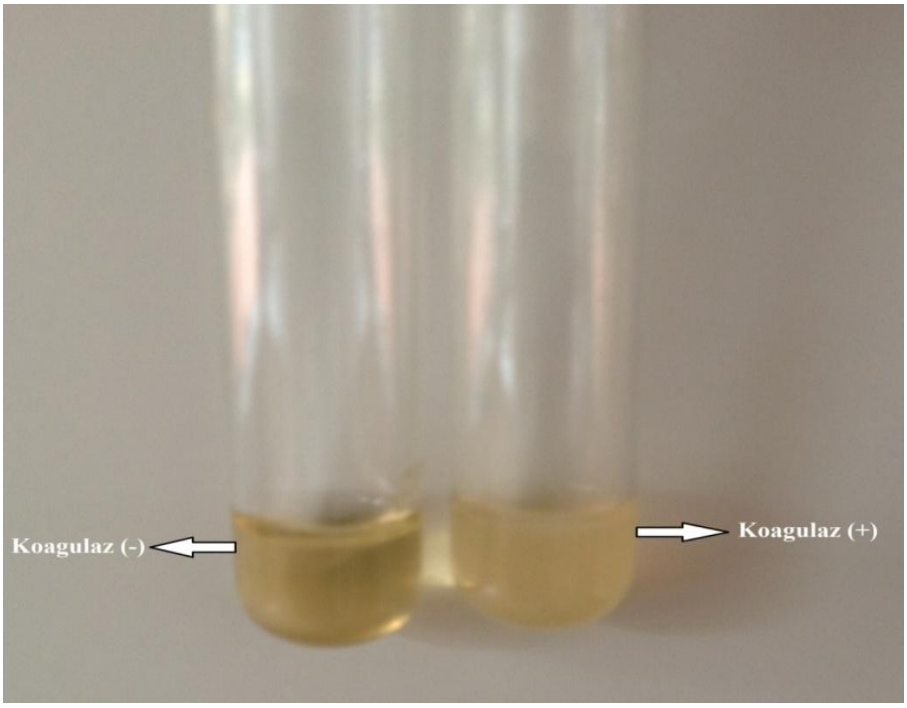
Alınan örneklerde stafilokok/mikrokokları saptamak için hazırlanan karışımdan Baird Parker Agar'a (BP, Merck 1.03785; Egg Yolk Tellurite-Emulsion, Merck 1.05406) damla plak yöntemine göre (0.1 ml) ekim yapılarak plaklar 35^oC'de 24-48 saat süreyle aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben besi yerinde üreyen siyah, parlak, konveks, 1-1,5 mm çapında ve/veya daha büyük, lesitinaz pozitif koloniler ile kahverengi ya da siyah renkte küçük zonsuz koloniler mikrokok/stafilokok olarak değerlendirildi (Bennett ve Lancette, 1998).

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

Mikrokok/stafilokok sayısının belirlenmesinin ardından, BP agarda üreyen tipik (siyah, parlak, konveks, 1-3 mm çapında, etrafında berrak zon oluşturan lesitinaz pozitif koloniler) ve/veya atipik kolonilerden örnekleme yoluyla 5 adet seçilerek EDTA koagulaz plazma (Oxoid, R21052) ile tüpte koagulaz testi yapıldı. Daha sonra, koagulaz testi pozitif olan koloniler, Gram boyama, katalaz test, Dnase aktivitesi, hemolitik özellikler (ß-hemoliz), clumping faktör (Staphylase test kit, Oxoid, DR0595) ve anaerob mannitol fermentasyon testi yönünden analiz edilip bu test sonuçları pozitif olan koloniler *S. aureus* olarak değerlendirildi (Anon., 2003).

2.2.2.3. Koagulaz Testi

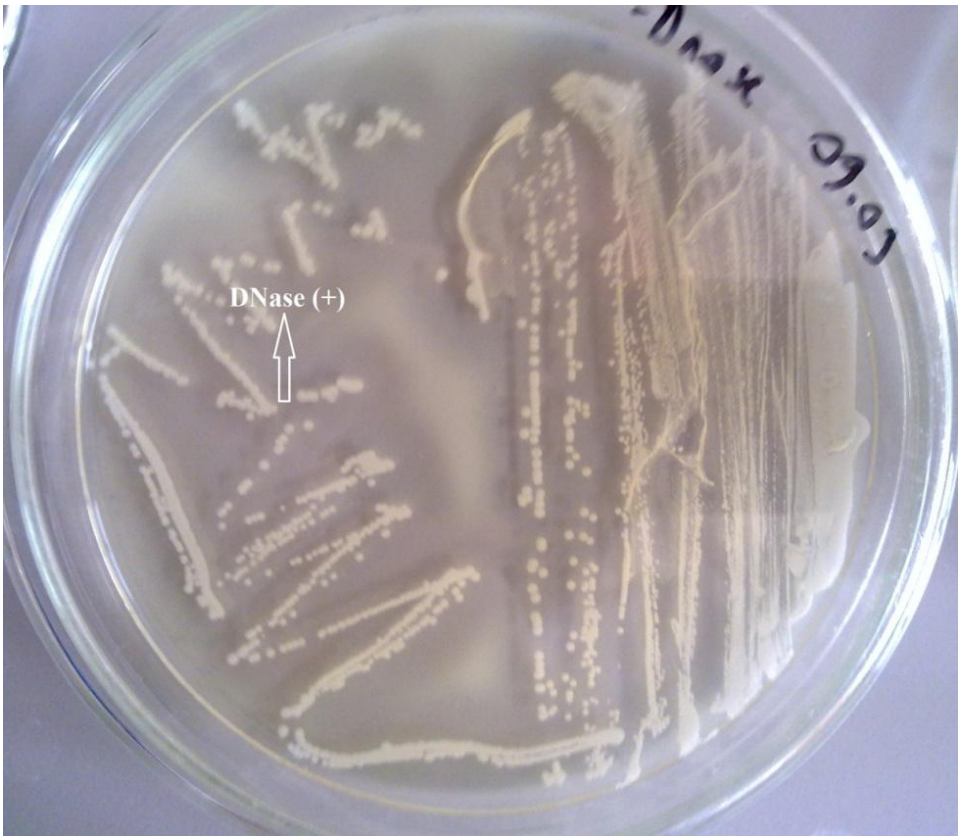
Koagulaz test için öncelikle test edilecek kolonilerden Brain Heart Infusion Broth'a (Oxoid, CM0225) geçilerek, suşların 18-24 saatlik sıvı kültürleri elde edildi. Daha sonra Bennett ve Lancette (1998) tarafından belirtilen yönteme göre koagulaz testi yapıldı. Bu amaçla, öncelikle plazma (Lyophilized Coagulase Rabbit Plasma with EDTA, Merck 1.13306) 3 ml steril distile su ile sulandırıldıktan sonra steril koagulasyon tüplerine 0,3'er ml olarak dağıtıldı. Daha sonra plazmaların üzerine test edilecek suşların 18-24 saatlik sıvı kültürlerinden 0,1 ml ilave edilip, 37^{o}C'de aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İlk 6 saat boyunca her 30 dk süre ile kontroller yapıldı ve pıhtılaşma oranları +1, +2, +3 ve +4 olarak değerlendirildi. Pıhtı gözlenen ve +3, +4 olarak değerlendirilen tüpler koagulaz (+) olarak belirlendi. Koagulasyon olmayan veya yeterli oranda pıhtı şekillenmeyen tüpler ise inkübasyona bırakılarak 24 saat sonra tekrar kontrol edildi (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Koagulaz pozitif izolatlar.

2.2.2.3. DNase Testi

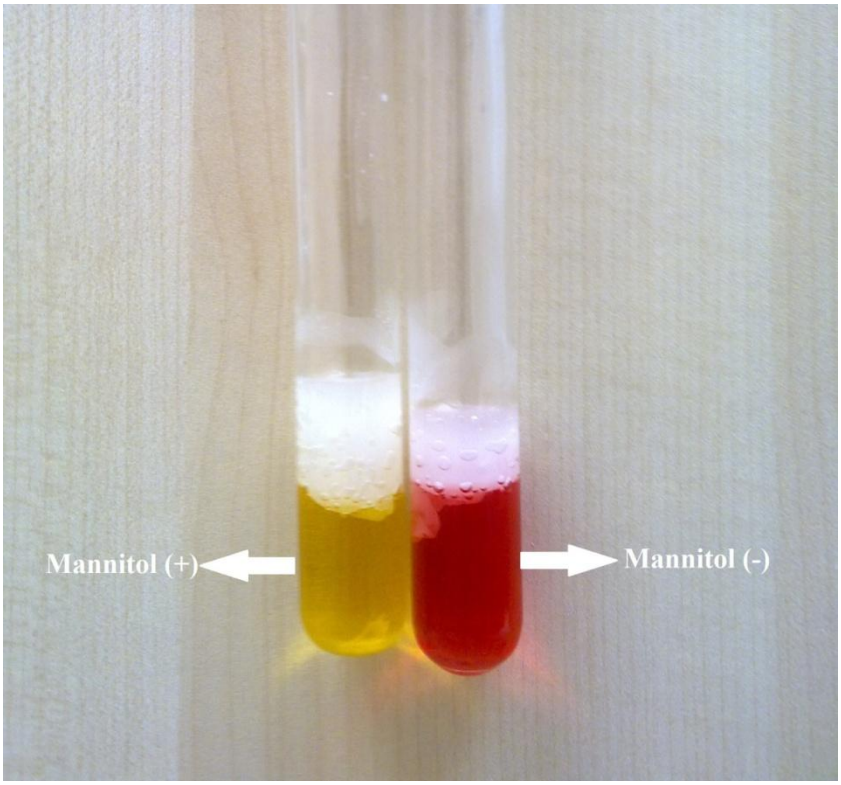
DNase enziminin varlığını belirlemek amacıyla yapılan bir testtir. Yatık agar üzerinden alınan koloniler, içerisinde 4-5 ml Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM0225) bulunan tüplerde süspanse edilerek, broth kültürü 37^{o}C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Broth kültürlerinden bir öze dolusu alınarak Dnase Agar'a (Oxoid, CM0321) çizme plak yöntemi ile ekim yapıldı ve plaklar 37^{o}C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda DNase agarda üreyen kolonilerin üzeri 1N HCI asit ile kaplandı. Birkaç dakika içinde kolonilerin etrafında berrak bir zonun oluşması pozitif, opak bir alanın oluşması ise negatif olarak değerlendirildi (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. DNase pozitif izolatlar.

2.2.2.4. Anaerobik Mannitol Fermentasyon Testi

Mannitolün *S. aureus* tarafından anaerobik olarak fermentasyonu diğer türlerden ayrımında önemlidir. Bu amaçla test edilecek suşun, sıvı besiyerinde hazırlanan kültüründen 1-2 öze dolusu alınarak, mannitol içeren phenol red broth base içerisine inoküle edilerek üzeri steril parafin ile kapatıldı. Bunu takiben tüpler 37°C'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonrası besiyeri renginin sarıya dönüşmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması negatif reaksiyon olarak kabul edildi (Şekil 2.3.) (Bennett ve Lancette, 1998).



Şekil 2.3. Mannitol pozitif izolatlar.

2.2.2.5. β- Hemoliz Testi

β-hemoliz oluşturan *S. aureus* kolonileri kanlı agarda düzgün bir hat ile çevrili berrak bir zon oluşturur. Bu amaçla test edilecek suşun, Brain Heart Infusion Broth'da kültivasyonu yapılarak, 1-2 öze dolusu alınıp kanlı agara çizme plak yöntemine göre ekimleri yapıldı. Daha sonra besi yerleri 37°C'de 1-7 gün süreyle inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonunda berrak hemoliz zonu bulunan koloniler β-hemoliz yönünden pozitif olarak kabul edildi (Şekil 2.4.).

2.2.2.6. Staphylase Testi

Bağlı koagulazın (clumping factor) tespiti amacıyla, Baird Parker Agar'da üreyen test edilecek koloniden bir öze yardımı ile alındı ve Staphylase Test Kitinin (Oxoid DR0595) reaksiyon kartı üzerine transfer edildikten sonra üzerine 1 damla test reaktifi damlatıldı. Daha sonra öze yardımıyla karıştırıldı ve kümeleşmenin (partiküller halinde toplanma) oluşması pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 2.4. β-Hemoliz + izolatlar.

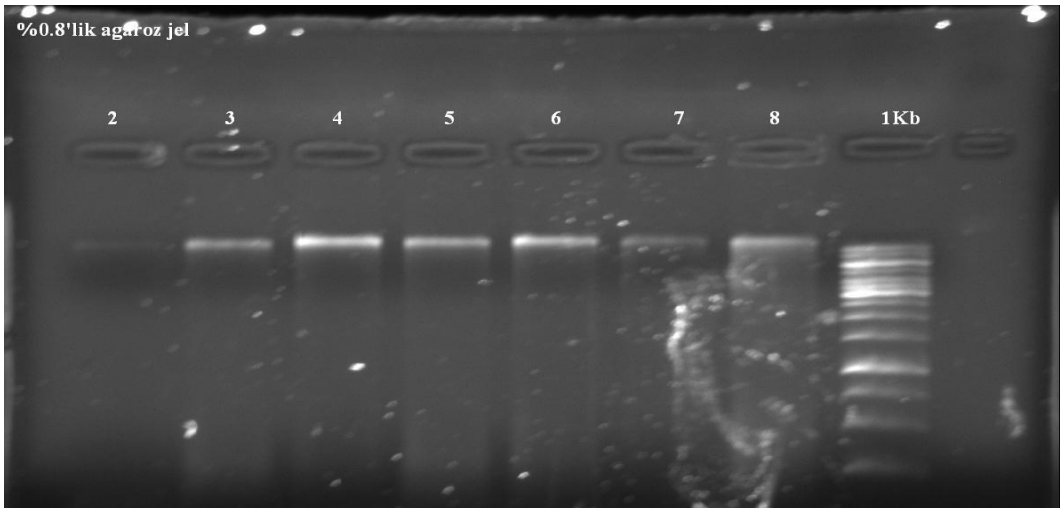
2.2.3. *S. aureus* İzolatlarının PCR Tekniği ile Doğrulanması

Fenotipik olarak *S. aureus* saptanan suşlar, PCR tekniği kullanılarak doğrulandı. Bu amaçla öncelikle koagulaz, DNase, anaerob mannitol, β-hemoliz ve Staphylase test sonuçları pozitif olan izolatların DNA ekstraksiyonları yapıldı. PCR koşulları optimize edildikten sonra, *S. aureus*'a özgü *nuc* geni ile stafilokoklara özgü *16S rRNA* gen sekansını oluşturan primer çiftleri kullanılarak amplifikasyon işlemleri yapıldı. Amplifikasyon işlemleri sonrası elde edilen PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jel elektroforezde yürütülerek, bu genlere özgü DNA bantları UV transiluminatör yardımıyla görüntülenerek değerlendirildi. Doğrulama işlemlerini takiben *S. aureus* olarak belirlenen izolatlarda, uniplex-multiplex PCR yöntemi uygulanarak *mecA, sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, tst,* genlerinin varlığı araştırıldı.

2.2.3.1. DNA Ekstraksiyonu

Doğrulanması yapılacak suşların, DNA ekstraksiyonları Akineden ve ark. (2008) belirttiği yönteme göre yapıldı. Bu amaçla, test edilecek suşlardan Brain Heart

Infusion Broth'a geçilerek, 37^{o}C'de 18-24 saat aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. Bunu takiben, bakteri kültüründen 2 ml eppendorf tüpüne alınarak 10 000 g'de 1 dk süreyle santrifüj (Biocen 22R) işlemi yapıldı. Daha sonra 180 µl TE buffer (Dzte1-05) ile 7 µl lysostaphin (Sigma, L7386-1 mg**)** ilave edilip, 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra DNA ekstraksiyonu için Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, 69506) kullanıldı ve üretici direktiflerine göre suşların ekstraksiyonu yapıldı.



Şekil 2.5. DNA ekstraksiyon görüntüsü.

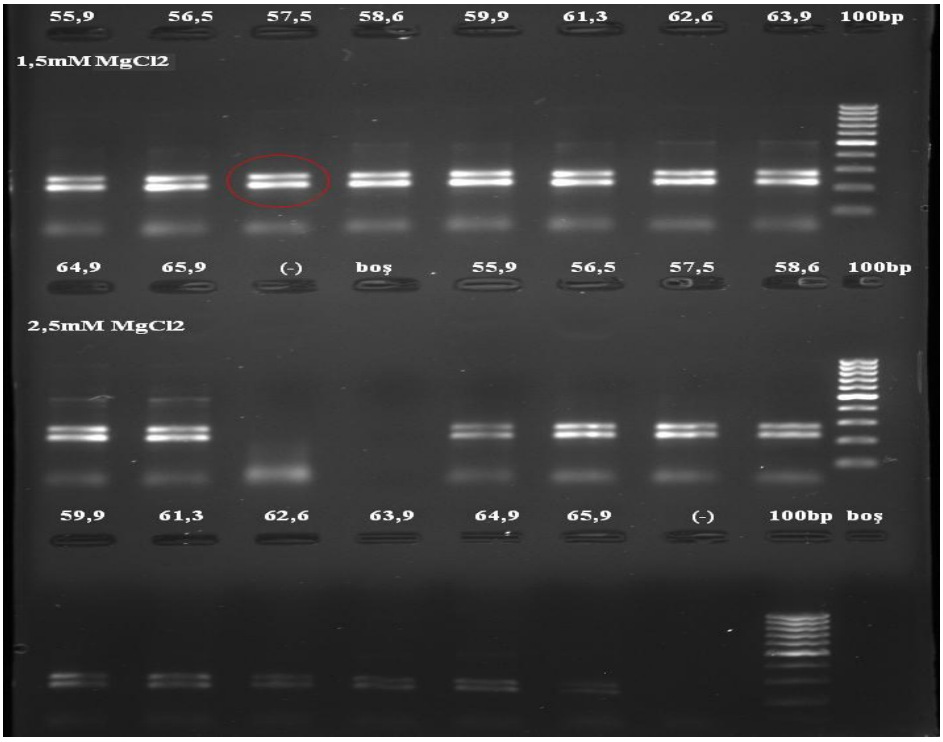
2.2.3.2. *nuc* ve *16S rRNA* Geninin Multiplex PCR Yöntemi ile Tespiti

S. aureus'un doğrulanması *nuc* ve *16S rRNA* geni kullanarak, Brakstad ve ark. (1992) ile Maes ve ark. (2002) tarafından önerilen standart PCR yöntemi ile tespit edildi.

2.2.3.2.1. Gradient PCR

Gradient PCR yöntemi ile optimum primer bağlanma sıcaklık derecesi ve Taq DNA polimeraz enziminin koenzimi olan optimum $MgCl_2$ oranının tespiti yapılmıştır. Bu amaçla 1,5 µl ve 2,5 µl oranlarında $MgCl_2$ ile 10 farklı bağlanma derecesinde (55,9°C; 56,5°C; 57,5°C; 58,6°C; 59,9°C; 61,3°C; 62,6°C; 63,9°C; 64,9°C; 65,9°C) PCR optimizasyonu sağlandı. Sonuç olarak optimum koşul olarak seçilen

amplifikasyon: 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 57,5°C'de 30 sn primer bağlanması (annealing) ve 72°C'de 40 sn primer uzaması (ekstensiyon) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Gradient PCR görüntüsü.

2.2.3.2.2. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu

Standart PCR, 25 µl hacimde master miks hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerine 17,1 µl ddH_2O, 2,5 µl 10 x PCR buffer (Dr. Zeydanlı Dzsb-15 1201S5), 1,5µl (25 mM) $MgCl_2$ (Dr. Zeydanli Dzmg-15 1201S6) 0,5 µl (10 mM) dNTP miks (Dr. Zeydanli Dz010-25 1203S2), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı Dztq-5 1107S7) ve 0,3 µl her bir *nuc* ve *16S rRNA* geni primerleri ile hazırlanan karışım vortekslendi. Hazırlanan master miksten 23'er µl alınıp içerisinde 2 µl template DNA bulunan Thermowell tüplere (Corning 3745, Thermowell Gold PCR Tubes, 0,2 ml, USA) dağıtılmıştır. Elde edilen toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslendi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Eppendorf, Mastercycler) 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 57,5 °C'de 30 sn primer

bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 40 sn primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.2.3. Agaroz Jel Elekteroforez

nuc ve *16S rRNA* geninin saptanması amacıyla, her bir örneğe ait 2 µl amplikon 2 µl boya (2xLoading Dye; Dr Zeydanlı Dzbfb-10) ile boyandı. 5 µl (10 mg/ml) oranında Ethidium bromide (Dr. Zeydanlı Dzeb-10) içeren %1,5'lik agaroz jel (Axygen Agr-Le-1001) 1x TBE solüsyonu kullanarak elekteroforez işlemi için hazırlandı. Daha sonra DNA marker (Bioron) 3 µl hacimde (25 µl DNA Ladder, 25 µl 6x Brom fenol mavisi jel yükleme solüsyonu, 100 µl ddH_2O solüsyonu) ve 2 µl 2x Loading Dye ile boyanan pozitif kontrol (ATCC 25923) ile negatif kontrol (Aynı hacimde hazırlanan master miks) ve örneklere ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek 100 volt elektrik akımında (Consort, Ev231) 30 dk süreyle elektroforez işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici Transilluminator (Wisd Wuv-L20) ve jel görüntüleme sistemleri ile (Kodak, Gel-logic 200) değerlendirildi.

2.2.3.3. *mecA* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti

nuc ve *16S rRNA* geni ile *S. aureus* olarak doğrulanan suşlar, Mehrotra ve ark. (2000) tarafından önerilen standart PCR yöntemi kullanarak *mecA* geninin tespiti yapılmıştır. *nuc* ve *16S rRNA* geni tespitinde uygulanan PCR koşulları *mecA* geninin tespitinde de kullanıldı.

2.2.3.3.1. PCR Protokolü ve Amplifikasyonu

Standart PCR, 25 µl hacimde master miks hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerine 17,7 µl ddH_2O, 2,5 µl 10 x PCR buffer (Dr. Zeydanlı Dzsb-15 1201S5),

1,5µl (25 mM) $MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı Dzmg-15 1201S6) 0,5 µl (10 mM) dNTP miks (Dr. Zeydanlı Dz010-25 1203S2), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı Dztq-5 1107S7) ve 0,3 µl her bir *mecA* geni primerleri ile hazırlanan karışım vortekslendi. Hazırlanan master miksten 23'er µl alınıp içerisinde 2 µl template DNA bulunan Thermowell tüplere (Corning 3745, Thermowell Gold PCR Tubes, 0,2 ml, USA) dağıtıldı. Elde edilen toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslendi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Eppendorf, Mastercycler) 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 57,5 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 40 sn primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.3.2. Agaroz Jel Elekteroforez

mecA geninin saptanması amacıyla, her bir örneğe ait 2 µl amplikon 2 µl boya (2xLoading Dye; Dr. Zeydanlı Dzbfb-10) ile boyandı. 5 µl (10 mg/ml) oranında Ethidium bromide (Dr. Zeydanlı Dzeb-10) içeren %1,5'lik agaroz jel (Axygen Agr-LE-1001) 1x TBE solüsyonu kullanarak elekteroforez işlemi için hazırlandı. Daha sonra DNA marker (Bioron) 3 µl hacimde (25 µl DNA Ladder, 25 µl 6x Brom fenol mavisi jel yükleme solüsyonu, 100 µl ddH_2O solüsyonu) ve 2 µl 2x Loading Dye ile boyanan pozitif kontrol (ATCC 43300) ile negatif kontrol (Aynı hacimde hazırlanan master miks) ve örneklere ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek 100 volt elektrik akımında (Consort, EV231) 30 dk süreyle elektroforez işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici Transilluminator (Wisd Wuv-L20) ve jel görüntüleme sistemleri ile (Kodak, Gel-logic 200) değerlendirildi.

2.2.3.4. Toksin Oluşturan Genlerin Multiplex PCR Yöntemi ile Tespiti

nuc ve *16S rRNA* geni ile *S. aureus* olarak doğrulanan suşlar, toksin genleri tespiti Mehrotra ve ark. (2000) ile Akineden ve ark. (2008) tarafından önerilen yönteme

göre ve hatalı primer bağlanmalarını önlemek amacıyla 3 set halinde, multiplex PCR yöntemi ile yapılmıştır.

Çizelge 2.3. PCR Setleri.

Set A	Set B	Set C
seb	*sec*	*sea*
see	*sej*	*seg*
seh	*sed*	
sei		

2.2.3.4.1. Set A PCR Protokolü ve Amplifikasyonu

Standart PCR, 30 µl hacimde master miks hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerine 20,1 µl ddH_2O, 3 µl 10 x PCR buffer (Dr. Zeydanlı Dzsb-15 1201S5), 1,8 µl (25 mM) $MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı Dzmg-15 1201S6) 0,5 µl (10mM) dNTP miks (Dr. Zeydanlı Dz010-25 1203S2), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı Dztq-5 1107S7) ve 0,3 µl her bir *seb, see, seh, sei* genleri primerleri ile hazırlanan karışım vortekslendi. Hazırlanan master miksten 28'er µl alınıp içerisinde 2 µl template DNA bulunan Thermowell tüplere (Corning 3745, Thermowell Gold PCR Tubes, 0.2 ml, USA) dağıtıldı. Elde edilen toplam 30 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslendi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Eppendorf, Mastercycler) 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 40 sn primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.4.2. Set B PCR Protokolü ve Amplifikasyonu

Standart PCR, 30 µl hacimde master miks hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerine 20,7 µl ddH_2O, 3 µl 10 x PCR buffer (Dr. Zeydanlı Dzsb-15 1201S5), 1,8 µl (25 mM) $MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı Dzmg-15 1201S6) 0,5 µl (10 mM) dNTP miks (Dr. Zeydanlı Dz010-25 1203S2), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı Dztq-5 1107S7) ve 0,3 µl her bir *sec, sej, sed* genleri primerleri ile hazırlanan karışım

vortekslendi. Hazırlanan master miksten 28'er µl alınıp içerisinde 2 µl template DNA bulunan Thermowell tüplere (Corning 3745, Thermowell Gold PCR Tubes, 0,2 ml, USA) dağıtıldı. Elde edilen toplam 30 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslendi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Eppendorf, Mastercycler) 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing) ve 72°C'de 40 sn primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.4.3. Set C PCR Protokolü ve Amplifikasyonu

Standart PCR, 30 µl hacimde master miks hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerine 20,1 µl ddH_2O, 3 µl 10 x PCR buffer (Dr. Zeydanlı Dzsb-15 1201S5), 3 µl (25mM) $MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı Dzmg-15 1201S6) 0,5 µl (10mM) dNTP miks (Dr. Zeydanlı Dz010-25 1203S2), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı Dztq-5 1107S7) ve 0,3 µl her bir *sea* ve *seg* genleri primerleri ile hazırlanan karışım vortekslendi. Hazırlanan master miksten 28'er µl alınıp içerisinde 2 µl template DNA bulunan Thermowell tüplere (Corning 3745, Thermowell Gold PCR Tubes, 0,2 ml, USA) dağıtıldı. Elde edilen toplam 30 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslendi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Eppendorf, Mastercycler) 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 64.6 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 40 sn primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.4.4. *tst* Geninin PCR Yöntemi ile Tespiti

Standart PCR, 25 µl hacimde master miks hazırlanarak gerçekleştirildi. PCR tüplerine 17,7 µl ddH_2O, 2.5 µl 10 x PCR buffer (Dr. Zeydanlı Dzsb-15 1201S5), 1,5 µl (25 mM) $MgCl_2$ (Dr. Zeydanlı Dzmg-15 1201S6) 0,5 µl (10 mM) dNTP miks (Dr.

Zeydanlı Dz010-25 1203S2), 0,2 µl Taq DNA polimeraz (Dr. Zeydanlı Dztq-5 1107S7) ve 03 µl *tst* genleri primerleri ile hazırlanan karışım vortekslendi. Hazırlanan master miksten 23'er µl alınıp içerisinde 2 µl template DNA bulunan Thermowell tüplere (Corning 3745, Thermowell Gold PCR Tubes, 0,2 ml, USA) dağıtıldı. Elde edilen toplam 25 µl hacimdeki PCR karışımı yeniden vortekslendi. Amplifikasyon, Thermal Cyclerde (Eppendorf, Mastercycler) 94°C'de 4 dk ön denatürasyon, 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55 °C'de 30 sn primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 40 sn primer uzaması (extention) aşamalarını kapsayan 35 siklus ve 70°C'de 10 dk ilave ekstensiyon işlemlerinden oluşmuştur. Elde edilen amplikonlar agaroz jel elektroforez aşamasına kadar 4°C'de muhafaza edildi.

2.2.3.4.5. Agaroz Jel Elekteroforez

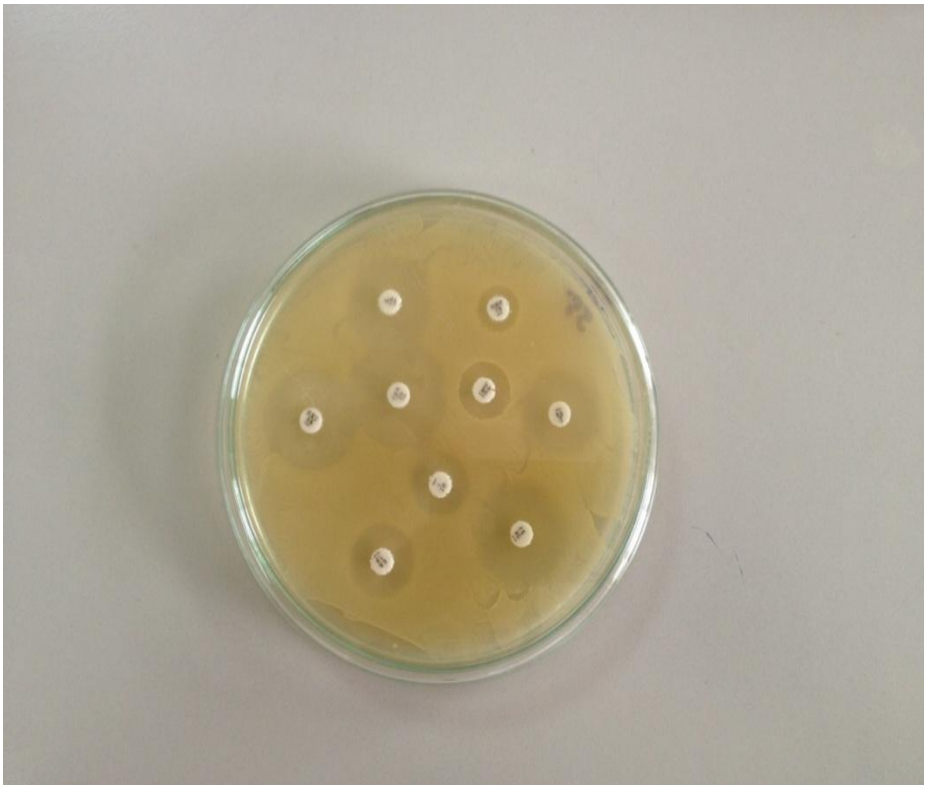
Toksin oluşturan genlerin tespiti amacıyla, her bir örneğe ait 2 µl amplikon 2 µl boya (2xLoading Dye; Dr. Zeydanlı Dzbfb-10) ile boyandı. 5 µl (10mg/ml) oranında Ethidium bromide (Dr. Zeydanlı Dzeb-10) içeren %1,5'lik agaroz jel (Axygen Agr-LE-1001) 1x TBE solüsyonu kullanarak elekteroforez işlemi için hazırlandı. Daha sonra DNA marker (Bioron) 3 µl hacimde (25 µl DNA Ladder, 25 µl 6x Brom fenol mavisi jel yükleme solüsyonu, 100 µl ddH_2O solüsyonu) ve 2 µl 2x Loading Dye ile boyanan pozitif kontrol (ATCC 43300) ile negatif kontrol (Aynı hacimde hazırlanan master miks) ve örneklere ait amplikonlar jeldeki kuyucuklara yüklenerek 100 volt elektrik akımında (Consort, EV231) 30 dk süreyle elektroforez işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA Marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV-görüntüleyici Transilluminator (Wisd Wuv-L20) ve jel görüntüleme sistemleri ile (Kodak, Gel-logic 200) değerlendirildi.

2.2.4. Antibiyotik Direncinin Tespiti

İzolatların antibiyotik direnci CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) (Anon., 2007) tarafından bildirilen disk difüzyon yöntemi esas alınarak yapılmıştır. Yatık agardan alınan koloniler, Brain Heart Infusion Broth bulunan tüplere süspanse edilerek, 35 ºC'de zenginleştirilmiştir. Zenginleştirilen broth kültürüne steril pamuk

swap daldırılıp, tüp içerisinde süzülerek Mueller- Hinton agar yüzeyine inokulum swap tekniği ile yayıldı.

Antibiyotik diskleri, agar yüzeyi ile temas edecek şekilde ve merkezleri arasındaki mesafe 24 mm'den yakın olmayacak biçimde 150 mm çapında her bir petriye 9 disk olmak üzere yerleştirildi. Daha sonra 35-37 ºC'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda disk etrafındaki inhibisyon zon çapı CLSI'ye göre değerlendirildi.



Şekil 2.7. Antibiyotik direnci için yapılan disk difüzyon testi görüntüsü.

2.2.5. Referans suşlar

Bu çalışmada referans suş olarak, Oxoid firmasından temin edilen *S. aureus* (Oxoid, ATCC 25923), *S. aureus* (Oxoid, ATCC 43300) suşları ile Dr. Ömer Akineden'den (Dairy Sciences, Institute of Veterinary Food Sciences, Justus-Liebig- University Giessen, Almanya) temin edilen, *S. aureus* NCTC 10652, *S. aureus* FDA 196E, *S. aureus* NCTC 10654 FDA 243, *S. aureus* NCTC 10655 137, *S. aureus* NCTC 10656 494, *S. aureus* FRI 918, *S. aureus* Ly 990055, *S. aureus* Ly 990552, *S. aureus* 2724, *S.aureus* 161/93 suşları kullanıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada Haziran 2011 ve Mayıs 2012 tarihleri arasında Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahada kesilen 120 adet sığır karkasından alınan örnekler gereç olarak kullanıldı. Alınan örnekler öncelikle stafilokok/mikrokoklar ve *S. aureus* yönünden analiz edildi. Bu analizler sonucu fenotipik olarak *S. aureus* olarak saptanan suşların PCR tekniği ile doğrulanması yapıldı. Bunu takiben PCR tekniği ile doğrulanan suşlar 9 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik dirençliliği ve PCR tekniği ile enterotoksin oluşturma yetenekleri ve *mecA* geninin varlığı yönünden analiz edildi.

3.1. Sığır Karkaslarında Koagulaz Pozitif Stafilokoklar ve *S. aureus*'un Varlığı

Bu çalışmada analiz edilen sığır karkaslarından, koagulaz pozitif stafilokoklar örneklerin 32'sinde (% 26,6), *S. aureus* ise 15'inde (% 12,5) tespit edilmiştir. Diğer örneklerde ise koagulaz pozitif stafilokok saptanma sınırı (< 1,0 x 10^1 kob/300 cm^2) altında bulunmuştur. Bu değerlere ilişkin sonuçlar Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

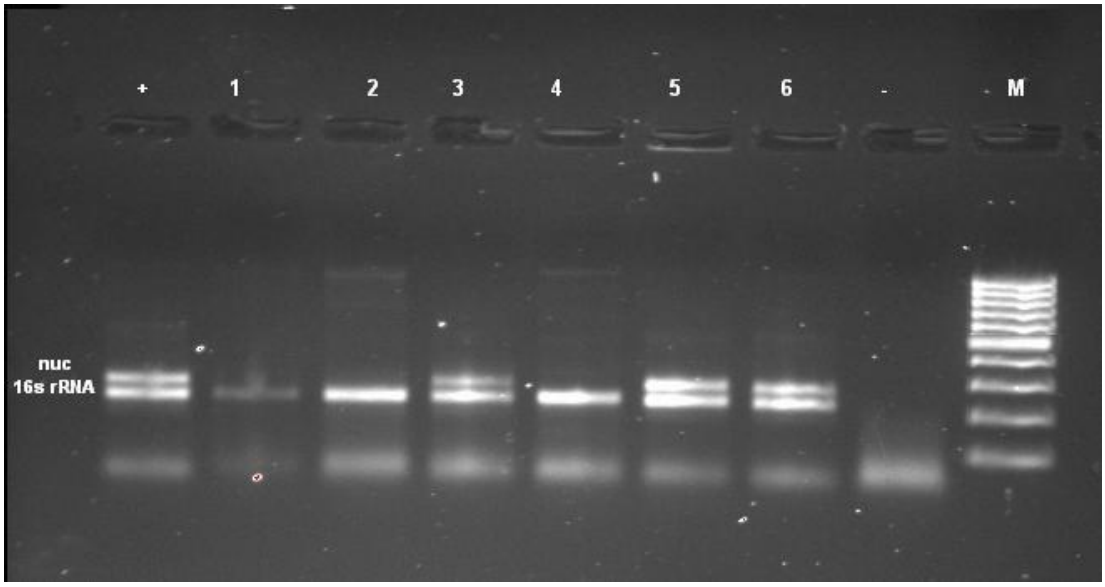
Çizelge 3.1. Sığır karkas örneklerinde koagulaz pozitif *S. aureus*'un bulunuşu.

Örnek	**Koagulaz pozitif stafilokok**	***S. aureus***
	Pozitif örnek sayısı/Toplam örnek sayısı (%)	Pozitif örnek sayısı/Toplam örnek sayısı (%)
Sığır karkas	32/120 (26,6)	15/120 (12,5)

Çalışmada toplam 177 adet izolat koagulaz testi yönünden kontrol edilmiş olup bu izolatlardan 70'i koagulaz-pozitif stafilokok olarak belirlenmiştir. Fenotipik testler sonucunda koagulaz-pozitif olarak belirlenen izolatların 22'si *S. aureus* olarak tanımlanmıştır.

3.2. PCR Sonuçları

Klasik kültür yöntemiyle *S. aureus* olarak belirlenen suşların 22'si de (% 100) PCR tekniğinde *S. aureus* olarak doğrulanmıştır (Şekil 3.1.). Aynı şekilde *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların, PCR tekniği ile *mecA* geni yönünden yapılan analizlerinde, izolatların hiçbirinin *mecA* genine sahip olmadığı anlaşılmıştır. Çalışma kapsamında, *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların enterotoksijenik özellikleri multiplex PCR tekniği ile yapılmış olup buna ilişkin sonuçlar Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.



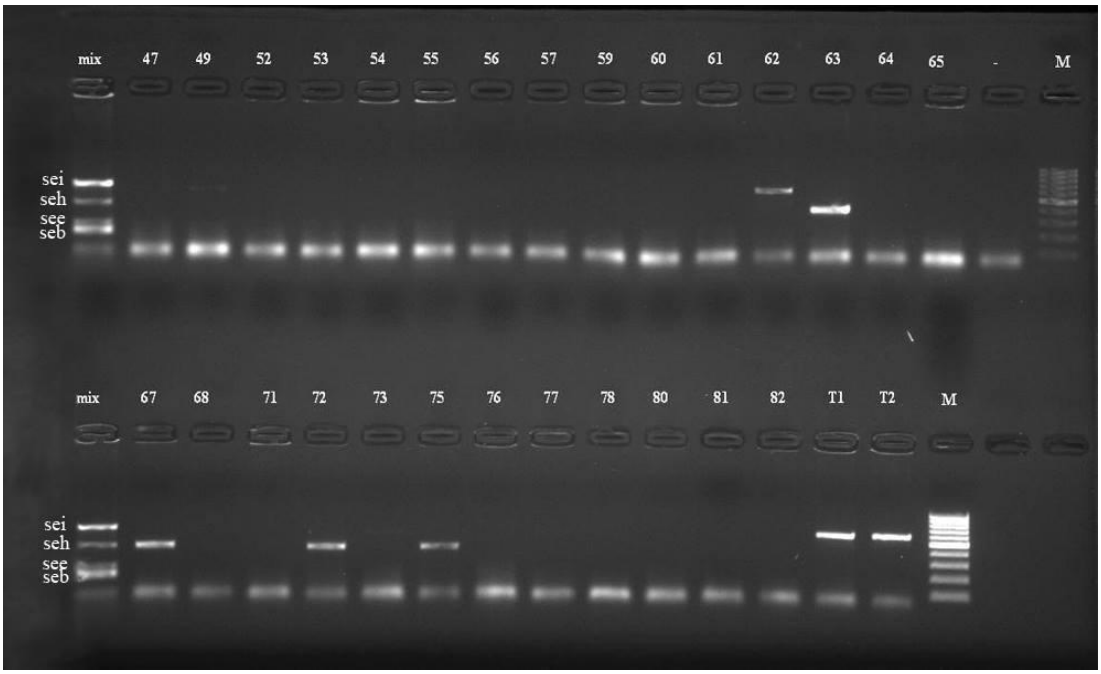
Şekil 3.1. *nuc* (279 bp) / *16S rRNA* (228 bp) genlerine göre *S. aureus* olarak doğrulanan izolatların Multipleks PCR görüntüsü. (M: Marker, +: Pozitif kontrol, 1-2-4: *S. aureus* negatif, 3-5-6: *S. aureus* pozitif.

Çizelge 3.2. *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik özellikleri.

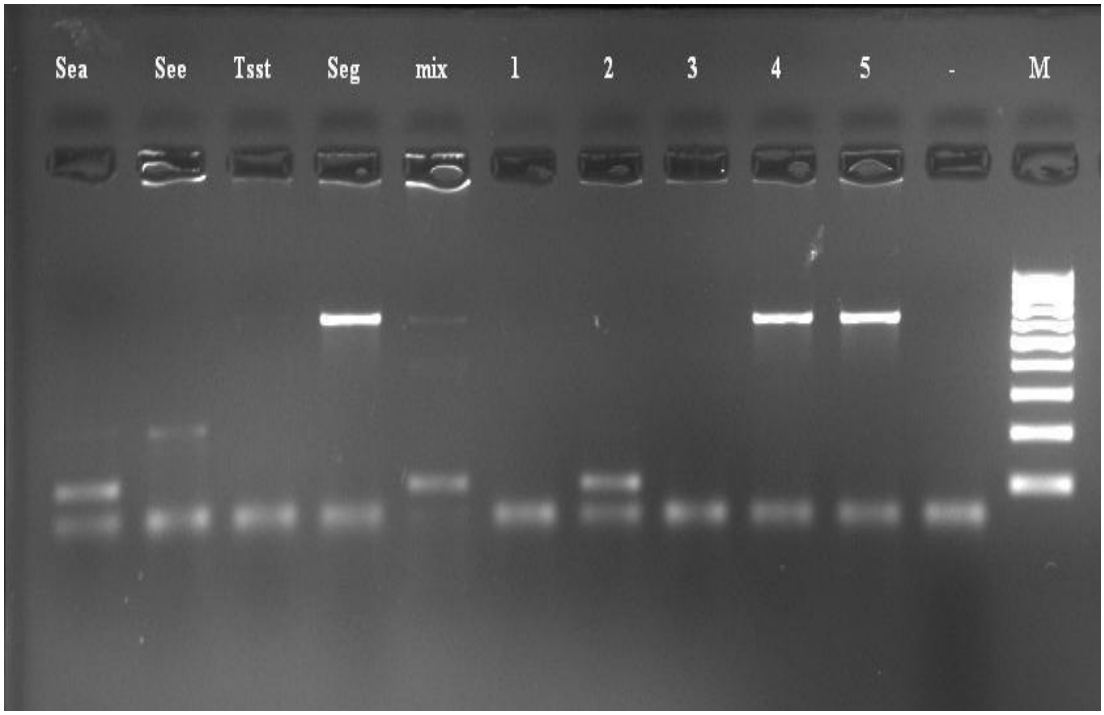
Enterotoksin geni	**İzolat Sayısı (%)**
seh	8 (% 36,3)
sea	5 (% 22,7)
sei	1 (% 4,5)
seg+sei	2 (% 9)
sed+sej	1 (% 4,5)
sea+tst	1 (% 4,5)
tst	1 (% 4,5)
-	3 (% 13,6)

n=22

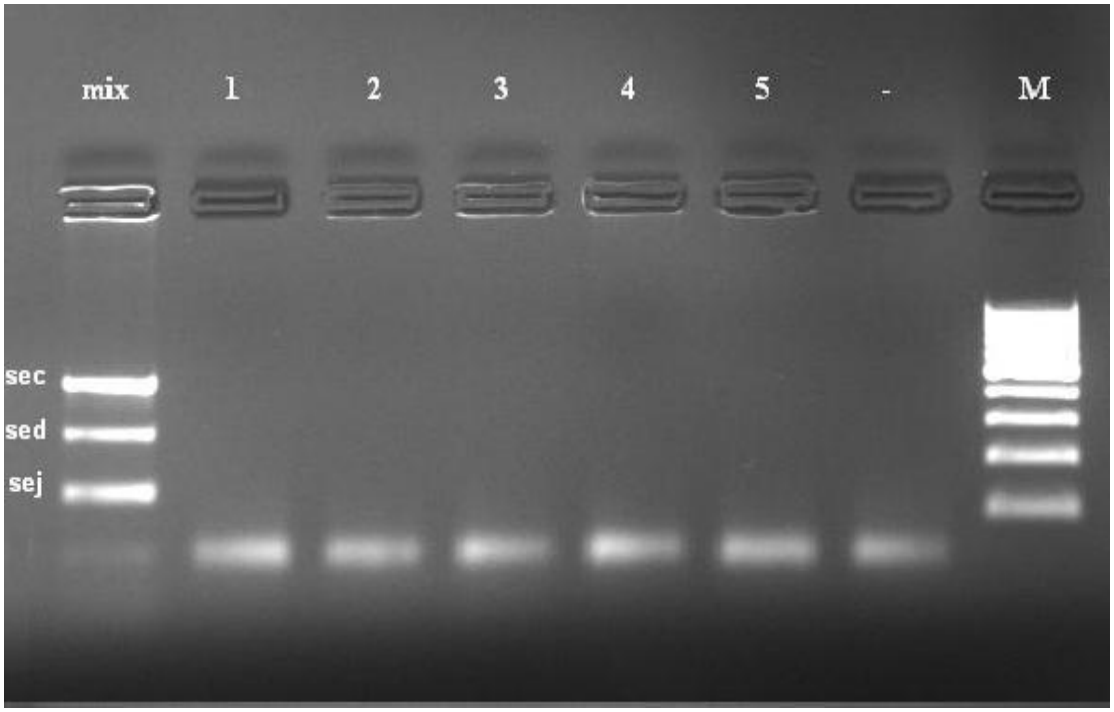
Çizelge 3.2.'de görüldüğü gibi, *S. aureus* olarak belirlenen izolatlardan 8'inin (% 36,3) *seh*, 5'inin (% 22,7) *sea*, 1'inin (% 4,5) *sei*, 2'sinin (% 9) *seg+sei*, 1'inin (% 4,5) *sed+sej*, 1'inin (% 4,5) *sea+tst*, 1'inin (% 4,5) ise *tst* enterotoksin genine sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca *S. aureus* izolatlarından 19'unun (% 86,3) farklı tip ve/veya tiplerde enteretoksin geni içerdikleri tespit edilmiştir. Bu izolatlardan 3'ünün (% 13,6) ise herhangi bir enterotoksin genine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Çalışmada enterotoksijenik stafilokokların klasik enterotoksinler olarak bilinen tiplerinin (*sea, seb, sec, sed, see, tst)* yanında, yeni olarak isimlendirilen *seh, seg, sei* ve *sej* tipi enterotoksin genlerine de sahip oldukları tespit edilmiştir. *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik özelliklerinin multipleks PCR tekniği ile yapılan analizlerine ilişkin PCR ürünlerinin görüntüsü Şekil 3.2.; 3.3.; 3.4.; 3.5.'de gösterilmiştir.



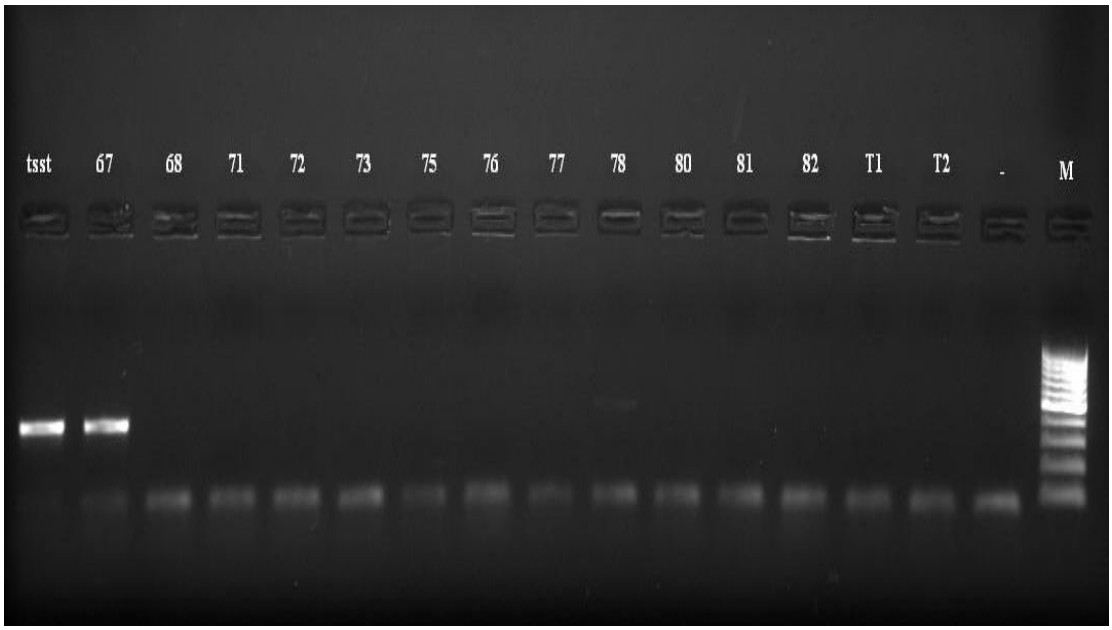
Şekil 3.2. *seb* (164 bp) / *see* (209 bp) / *seh* (376 bp) / *sei* (577 bp) Enterotoksin genleri Multipleks PCR görüntüsü (M: Marker, mix: Pozitif kontroller, 62-T1-T2: *sei* pozitif, 63-67-72-75: *seh* pozitif).



Şekil 3.3. *sea* (102 bp) / *see* (209 bp) / *tst* (350 bp) / *seg* (642 bp) Enterotoksin genleri Multipleks PCR görüntüsü (M: Marker, *sea-see-tst-seg*-mix: Pozitif kontrol, -: Negatif kontrol 2: *sea* pozitif, 4-5: *seg* pozitif).



Şekil 3.4. *sej* (142 bp) / *sed* (278 bp) / *sec* (451 bp) Entertoksin genleri Multipleks PCR görüntüsü (M: Marker, mix: Pozitif kontrol, -: Negatif kontrol, 1-2-3-4-5: *sej, sed, sec* negatif).



Şekil 3.5. *tst* (350 bp) geni PCR görüntüsü (M: Marker, Tsst: Pozitif kontrol, -: Negatif kontrol, 67: *tst* pozitif).

3.3. Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları

Çalışma kapsamında, *S. aureus* olarak identifiye edilen izolatlar 9 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri yönünden test edilmiş olup, bunlara ilişkin sonuçlar Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. *S. aureus* izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı dirençliliği.

Antibiyotikler	**Dirençli Pozitif suş (%)**	**Orta Düzeyde Dirençli Pozitif suş (%)**	**Duyarlı Pozitif suş (%)**
Ampisilin	16 (% 72,7)	0	6 (% 27,2)
Tetrasiklin	12 (% 54,5)	0	8 (% 36,3)
Eritromisin	9 (% 40,9)	5 (% 22,7)	8 (% 36,3)
Sülfametaksazol Trimetoprim	5 (% 22,7)	0	17 (% 77,2)
Oksasilin	4 (% 18,1)	2 (% 9,0)	16 (% 77,2)
Sefoksitin	3 (% 13,6)	0	19 (% 86,3)
Kloramfenikol	2 (% 9,0)	0	20 (% 90,9)
Gentamisin	1 (% 45,5)	0	21 (% 95,4)
Vankomisin	0	0	22 (% 100)

n= 22

Çizelge 3.3.'de görüldüğü gibi, yapılan antibiyotik dirençliliği testleri sonucunda *S. aureus* izolatlarından % 72,7 (16/22)'sinin ampisiline, % 54,5 (12/22)'sinin tetrasikline, % 40,9 (9/22)'unun eritromisine ve % 22,7 (5/22)'sinin sülfametaksazol-trimetoprim'e yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır. Bu antibiyotikleri oksasilin, sefoksitin, kloramfenikol ve gentamisin izlemiştir. İzolatların tamamı ise vankomisine duyarlı bulunmuştur.

Buna ilaveten izolatların tamamı vankomisin hariç en az 1 antibiyotiğe, 16 izolat en az iki, 9 izolat en az üç, 6 izolat en az dört farklı antibiyotiğe dirençli ya da orta düzeyde dirençli olarak saptanmıştır.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahada kesilen 120 adet sığır karkası koagulaz-pozitif stafilokoklar ve *S. aureus*'un varlığı yönünden analiz edildi. Bunu takiben, yapılan analizler sonucu fenotipik olarak *S. aureus* saptanan izolatların PCR tekniği ile doğrulanması yapıldı. PCR tekniği ile doğrulanan izolatlar enterotoksijenik özellikleri, *mecA* geninin varlığı ve 9 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik dirençliliği yönünden test edildi. Çalışma sonucunda 120 sığır karkasından 32'sinin (% 26,6) koagulaz-pozitif stafilokok ve 15'inin ise (% 12,5) *S. aureus* yönünden pozitif olduğu tespit edidi.

Sığır karkaslarında koagulaz-pozitif stafilokokların varlığı üzerine yapılan değişik çalışmalarda, koagulaz-pozitif stafilokokların farklı düzeylerde bulunduğu bildirilmektedir. Vanderlinde ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmada, koagulaz-pozitif stafilokokların % 29 düzeyinde bulunduğu belirtilmiştir. Aynı şekilde Phillips ve ark. (2001) ile Phillips ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmalarada ise koagulaz-pozitif stafilokokların sırasıyla % 25,3 ve % 28,7 düzeyinde bulunduğu bildirilmiştir. Normanno ve ark. (2005) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise incelenen 11 384 adet farklı gıda örneklerinden 1 971'inin (% 17,3) koagulaz-pozitif stafilokoklar ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada koagulaz-pozitif stafilokoklar % 26,6 düzeyinde bulunmuş olup araştırmacıların sonuçlarıyla genelde uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak Hansson ve ark. (2001) ile Özdemir ve ark. (2010) tarafından yapılan diğer çalışmalarda ise sığır karkaslarında koagulaz-pozitif stafilokoklar sırasıyla % 34-42 ve % 38,3 düzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırmacıların bu verileri, bu çalışmada tespit edilen % 26,6 düzeyinden biraz yüksektir. Bulgular arasındaki farklılıkların muhtemelen birden fazla nedenden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi stafilokoklar, hayvanlar ile insanların deri ve mukozalarında normal floraya dahil olan bakterilerdir. Ayrıca, *S. aureus,* hayvan ve insanların yara infeksiyonlarından yüksek düzeyde izole edilmekte olup sağlıklı insanların burun mukozalarında da bulunduğu bilinmektedir. *S. aureus*'un başta sığır karkasları olmak üzere, değişik gıdalarda bulunmasının önemli nedenleri arasında en başta üretimin farklı aşamalarında gerekli hijyenik

tedbirlerin alınmaması gelmektedir. Ayrıca özellikle üretim sonrası personel kaynaklı sekonder kontaminasyonlar da stafilokokal gıda intoksikasyonlarında yüksek oranda rol oynamaktadır. Bunların dışında kesimhaneler arasında hijyenik koşulların farklılığı, kesim teknikleri, kesim kapasiteleri, örnekleme teknikleri, örnekleme zamanları gibi faktörler de mikrobiyolojik analiz sonuçlarının farklı oluşunda önemli rol oynarlar. Dolayısıyla Özdemir ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, sığır karkaslarından örnekleri eksizyon yöntemine göre almışlardır ve araştırmacılar (Ware ve ark., 1999; Miraglia ve ark., 2005; Pepperell ve ark., 2005) eksizyon yöntemiyle alınan örneklerde mikroorganizma sayılarının swap tekniği ile alınan örneklere göre daha fazla oranda olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sığır karkaslarından alınan örneklerin zamanlaması da önemlidir. Benzer olarak Desmarchelier ve ark. (1999) tarafından Avustralya'da yapılan çalışmada, 3 farklı sığır mezbahasından alınan karkas örneklerinde koagulaz-pozitif stafilokok oranları % 20 ile % 68,6 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar koagulaz-pozitif stafilokok oranını iç organ çıkarma öncesi alınan örneklerde % 6,5 düzeyinde bulmasına karşın, bu oranın iç organ çıkarma sonrası alınan örneklerde % 40'a kadar ulaştığını ve bu durumun iç organ çıkarma sonrası karkasın özellikle boyun ve döş bölgelerinin daha fazla kontamine olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, toplam 120 sığır karkasının 15'inde (% 12,5) *S. aureus* saptanmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda (Nitzsche ve ark. 2007; Pesavento ve ark., 2007; Pu ve ark. 2009; Lim ve ark. 2010; Hanson ve ark. 2011) değişik hayvan türlerine ait etlerde *S. aureus* düzeyinin farklı seviyelerde bulunduğu rapor edilmiştir. Lim ve ark. (2010) tarafından Kore'de yapılan bir çalışmada, mezbahadan alınan 847 adet, marketlerden alınan 43 adet olmak üzere toplam 890 adet sığır eti örneğinin 86'sının % 9,7 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde Normanno ve ark. (2007a) tarafından yapılan çalışmada, 993 adet et ürünü örneğinin % 10'ununda *S. aureus* tespit edilmiştir. Araştırmacıların bulguları ile bu çalışmanın bulguları arasında uyum görülmüştür.

Hanson ve ark. (2011) tarafından ABD'de yapılan çalışmada, piyasadan alınan 55 adet domuz, 45 adet piliç, 29 adet sığır eti ve 36 adet hindi eti örneklerinde *S. aureus* sırasıyla % 18,2, 17,8, 6,9 ve 19,4 düzeyinde saptanmıştır. Pu ve ark. (2009) ise 90 domuz, 30 sığır eti olmak üzere toplam 120 örnekte yaptığı çalışmada

domuz etlerinin 41'inde (% 45,6), sığır etlerinin ise 6'sında (% 20) *S. aureus* saptamışlardır. Benzer şekilde, Pesavento ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada 176 adet et örneğinden (sığır, kanatlı, domuz) 42'sinin (% 23,8) *S. aureus* yönünden pozitif bulunduğu bildirilmiştir. Bhargava ve ark. (2011) ise ABD'nde yaptıkları çalışmada, 289 çiğ et örneğinden (sığır, piliç, hindi) 65'inin (% 22,5) *S. aureus* yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. Jackson ve ark. (2013) sığır eti ve ürünleri ile domuz eti örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, sığır eti orijinli ürünlerde *S. aureus*'un % 63, domuz eti orijinli ürünlerde ise % 45 düzeyinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Kitai ve ark. (2005) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, toplam 444 adet piliç eti örneğinden 292'sinin (% 65,8) *S. aureus* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde Van Loo ve ark. (2007) tarafından Hollanda'da yapılan çalışmada, analiz edilen 79 adet sığır ve domuz orijinli et ürünü örneğinin 36'sının *S. aureus* yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Hanson ve ark. (2011) dışında, diğer araştırmacıların farklı hayvan türlerine ait etlerde *S. aureus*'un varlığına ilişkin sonuçları, bu çalışmadaki *S. aureus*'a ait veriden (% 12,5) yüksektir. Sonuçlar arasındaki farklılığın muhtemel sebepleri arasında; örneklerin farklı oluşu ile örnekleme zamanları ve hijyenik koşulların farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Yılmaz ve Gümüş (2008) yaptıkları çalışmada, mezbaha ve kasaplardan alınan 300 karkas örneği içerisinde *S. aureus*'un mezbahadan alınan örneklerde % 30, kasaplardan alınan örneklerde ise % 80 düzeyinde bulunduğunu bildirmiştir. Kasaplardan alınan örneklerde *S. aureus* oranın yüksek oluşunu nakil sırasındaki ve kasaplardaki hijyen eksikliğinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, izole edilen toplam 70 adet koagulaz-pozitif stafilokok izolatından 22'si fenotipik ve PCR analizi sonucu *S. aureus* olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde Nitzsche ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, domuz karkaslarından izole edilen 337 adet koagulaz-pozitif stafilokok izolatından 142'sinin *S. aureus* olduğunu bildirmişlerdir. Buna ilaveten araştırmacılar diğer koagulaz-pozitif izolatların *S. hyicus* olduğunu ve 142 adet *S. aureus* izolatından % 67,2'sinin *S. aureus* için tipik β-δ-hemoliz, % 23,3'nün ise sadece β-hemoliz oluşturduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada, izole edilen 22 *S. aureus* izolatından 19'unun (% 86.3) enterotoksijenik özellikte olduğu tespit edilmiştir. Enterotoksijenik izolatlardan 8'inin (% 36,3) *seh*, 5'inin (% 22,7) *sea,* 2'sinin (% 9) *seg+sei*, 1'inin (% 4,5) *sei,* 1'inin (% 4,5) *sed+sej*, 1'inin (% 4,5) *sea+tst* ve 1'ininde (% 4,5) *tst* tipi enterotoksin genine sahip olduğu saptanmıştır. Aydın ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, incelenen 1070 adet gıda örneğinden 147'si (% 13.8) *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar izolatların 92'sinin (% 62,6) enterotoksijenik özellikte olduğunu belirterek, bunlardan % 53,3'ünün yeni izole edilen (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq,* ve *seu*) toksin genlerine, klasik toksinlerden daha fazla oranda sahip olduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Arcuri ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada da, toplam 291 *S. aureus* izolatından 109'unun en az bir enterotoksin geni taşıdığı bildirilmiş olup, izolatlardan 87'sinin yeni tanımlanan enterotoksin genlerine sahip oldukları ve 8 izolatın ise *tst* geni taşıdığı saptanmıştır. Yine Bania ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada, çeşitli et ve et ürünlerinden izole edilen enterotoksijenik 27 izolattan 9'u klasik enterotoksinleri üretme yeteneğinde bulunmuş olmasına karşın, 18 izolatın yeni tanımlanan enterotoksin genlerine sahip oldukları tespit edilmiştir. Aynı şekilde Pereira ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, değişik gıdalardan izole edilen 148 koagulaz-pozitif stafilokok izolatından % 69'unun bir veya birden fazla enterotoksin geni taşıdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu genler içinde en fazla *sea-seg* (% 26), *sea-seg-sei* (% 23) ve *seg-sei* (% 25) genleri olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarında, özellikle yeni tanımlanan enterotoksin genlerinin daha fazla sayıda saptamış olması ile bu çalışmanın bulguları arasında uyumluluk bulunmaktadır.

Benzer şekilde, Rosec ve Gigaud'da (2002) değişik gıdalardan izole ettikleri 332 *S. aureus* izolatının PCR tekniği ile yapılan analizlerinde % 57'sinin hem klasik (*sea, seb, sec, sed* ve *sef*) enterotoksin genlerini hem de yeni tanımlanan enterotoksin genlerini (*seg, seh, sei, sej*) içerdiklerini rapor etmişlerdir. Normanno ve ark. (2007a) ise çalışmalarında izole edilen 125 enterotoksijenik *S. aureus* izolatından % 33,6'sının *sed*, % 18,4'ünün *sea*, % 15,2'sinin *sec* ve % 6,4'ünün ise *seb* tipi enterotoksin genlerine sahip olduklarını saptamışlardır. Bu çalışma ile değişik araştırmacıların çalışmalarında izole edilen *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik

özellikleri arasındaki farklılıkların bulunması ise doğal bulunmuştur. İzolatların enterotoksijenik özelliklerinin farklı oluşunun muhtemel nedenlerinin başta örnek tipleri olmak üzere, kontaminasyon kaynakları ile metodolojik farklılıklara bağlanabilir.

Bu çalışmada, *S. aureus* izolatlarının hiçbirinde *mecA* geni saptanamamıştır. Bu konuda yapılan benzer çalışmalarda, *S. aureus* izolatlarında *mecA* geninin varlığına ilişkin değişik bulgular bildirilmiştir. Bu kapsamda Bhargava ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada, 289 çiğ et örneğinden (sığır, piliç, hindi) izole edilen *S. aureus* izolatlarından 6'sının (2'si sığır eti % 1,3, 3'ü piliç eti % 3,9, 1'i hindi eti % 1,7) *mecA* genine sahip olduklarını bildirilmiştir. Araştırmacılar ilave olarak çalışmalarında bulunan MRSA izolat sayısının az olmasının nedenini, ABD'inde yapılan diğer çalışmalar referans gösterilerek, örneklerin domuz ve domuz eti kaynaklı olmamasından kaynaklanabileceği şeklinde değerlendirmişlerdir. Aynı şekilde Jackson ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, sığır eti orijinli örneklerin % 4'ünde, domuz eti orijinli örneklerin % 3'ünde *mecA* geni tespit edildiği bildirilmiş olup, izolatların PFGE tekniği ile yapılan analizlerinde sığır kaynaklı MRSA izolatlarının insan kaynaklı izolatlarla yakın akrabalık içerisinde oldukları değerlendirilmiştir.

Aynı şekilde Lim ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada, sığır kesimhanelerinden alınan 847 sığır eti örneğinin 4'ünde (% 0,4) ve marketlerden alınan 43 adet sığır eti örneğinin ise 5'inde (% 11,6) MRSA izolatı tespit edildiği belirtilmiştir. De Boer ve ark. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise analiz edilen toplam 2 217 adet (sığır, domuz, koyun-kuzu piliç, hindi, av hayvanı) et örneğinin 264'ünde (% 11,9) MRSA izolatı bulunduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde Van Loo ve ark. (2007) sığır ve domuz etlerinden izole edilen 36 adet *S. aureus* izolatından 2'sinin MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Yine Kitai ve ark. (2005) piliç eti orijinli 714 *S. aureus* izolatından 2'sinin MRSA ve insan orijinli olduğunu tespit etmişlerdir. Pu ve ark. (2009) ise domuz ve sığır etlerinden izole edilen 6 adet metisiline dirençli *S. aureus* izolatından 5'inin domuz, 1'inin ise sığır eti orijinli olduğunu ve suşların Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) tekniği kullanılarak yapılan akrabalık yakınlığı analizinde, 2 farklı tipte olduğunu saptamışlardır. Dolayısıyla bu çalışmada izole edilen 22 adet *S. aureus* izolatında, *mecA* geninin

bulunmamasının muhtemel nedenleri arasında, izolat sayısının az olması ve örnek tiplerinin farklı oluşundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada, yapılan antibiyotik dirençlilik testleri sonucunda *S. aureus* izolatlarından % 72,7'sinin ampisiline, % 54,5'inin tetrasikline, % 40,9'unun eritromisine ve % 22,7'sinin sülfametaksazol-trimetoprim'e yüksek oranda dirençli olduğu saptanmış olup, bu antibiyotikleri oksasilin % 18,1, sefoksitin % 13,6, kloramfenikol % 9 ve gentamisin % 4,5 takip etmiştir. Bu çalışmada izole edilen izolatların tümü ise vankomisine duyarlı bulunmuştur. Benzer konuda yapılan çalışmalarda da, *S. aureus* izolatlarının farklı antibiyotiklere karşı dirençliliklerinde farklılıklar bulunduğu anlaşılmaktadır. Bu bağlamda Hanson ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada etlerden izole edilen 27 adet *S. aureus* izolatından 21'inin (% 77,7) penisiline; 18'inin (% 66,7) tetrasikline, 2'sinin (% 7,4) ise oksasiline dirençli olduğu belirtilmiştir. Aynı şekilde Normanno ve ark. (2007a) tarafından yapılan çalışmada da, *S. aureus* izolatlarından % 68,8'inin en az bir antibiyotiğe karşı dirençli bulunduğu ve insan orijinli izolatların diğer izolatlara göre daha fazla çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip oldukları saptanmıştır. Pesavento ve ark. (2007) sığır, domuz ve kanatlı eti orijinli 42 adet *S. aureus* suşundan, 28'inin test edilen 12 değişik antibiyotikden en az birine dirençli bulunduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Pereire ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, β-laktam grubu antibiyotik dirençlilik sonuçlarının oksasilin % 38, ampisilin % 70 ve penisilin % 73 düzeyinde bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca gıdaların, antibiyotik direncinin insanlara taşınmasında önemli bir araç olabileceğini belirtmiş olup, bu direncin taşınmasında gıdalarda bulunan antibiyotik rezidüleri veya dirençli gıda patojenlerinin transferi ile mümkün olabileceğini vurgulamışlardır.

Nitzsche ve ark (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, domuz karkaslarından izole edilen *S. aureus* izolatlarından yaklaşık % 52,8'nin ampisilin ve penisiline birlikte direnç gösterdikleri, % 22,2'sininde sadece penisiline dirençli olduğu saptanmıştır. Türkiye'de benzer konuda Gündoğan ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada ise, sığır, kuzu ve piliç eti örneklerinden izole edilen 80 adet *S. aureus* izolatından % 67,5'nin metisiline dirençli olduğu, piliç eti orijinli izolatlarda ise metisiline dirençliliğin % 76,4 düzeyinde bulunduğu rapor edilmiştir.

Schlegelova ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada, toplam 140 adet (70 adet swap, 70 adet sığır eti) olmak üzere kesim işleminden sonra alınan örnekleri incelemişlerdir. Toplam 70 karkasın 35'i boyun bölgesi, 35'i ise karkasın arka bölgesinden alınan swaplar kullanılarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda % 7,5 oranında *S. aureus,* bu orandan daha fazla % 52,2 oranında koagulaz negatif stafiloklar (KNS) ile kontaminasyon şekillendiği tespit edilmiştir. Sığır etinde meydana gelen kontaminasyonun swap ile alınan karkas örneklerinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca koagulaz negatif stafilokların kontaminasyonda daha fazla etkili oldukları belirtilmiştir. Bu çalışma ile diğer et ürünleri üzerine yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında da benzer bir ilişki görülmektedir. Bu durumun meydana gelmesinde işlenmiş et ürünlerinde meydana gelen insan kaynaklı stafilokok kontaminasyonu gerekçe olarak gösterilebilir.

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin çeşitli hastalıkların tedavisinde özellikle tercih edilmesi birçok bakteride çoklu antibiyotik direncine sebep olmaktadır. Bu nedenle; bakterilere karşı spesifik antibiyotiklerin seçimi, antibiyotik direncinin bakteriler arasında geniş çaplı yayılımlarının önlenmesi bakımından önemlidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *S. aureus*'un sığır karkas örneklerinde varlığı tespit edilmiştir. Gıda intoksikasyonları bakımından izole edilen *S. aureus* izolatlarından çoğunun enteretoksijenik özellikte olması önemlidir. Ayrıca enteretoksijenik özellikteki bu izolatların klasik enterotoksinlerin yanında, yeni tanımlanan enterotoksin genlerine sahip olduklarının tespitinin yapılması, bu tip enterotoksinlerin de gıda intoksikasyonlarına neden olabileceğinin bir kanıtıdır. Buna ilave olarak toksik şok sendromunu oluşturan *tst* geni tespiti de halk sağlığı açısından dikkat edilmesi gereken bir durumdur.

Aynı şekilde izolatların çoğu bir ve/veya birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde *mecA* genine ratlanmamasına rağmen, metisilin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan oksasilin ve sefoksitin gibi antibiyotiklere karşı dirençli izolatlar tespit edilmiştir. Bu durum MRSA riskinin olduğunu ve gıda aracılı transferin mümkün olabileceğini göstermektedir. Bu kapsamda, antibiyotiklerin yoğun bir şekilde ve bilinçsiz kullanımının önlenmesi ve gerekli kontrollerin yapılarak, kalıntı izleme programlarının etkin olarak sürdürülmesi gerekmektedir. Özellikle antibiyotik tedavisi gereken hastalıklarda antibiyogram testi gibi yöntemler kullanılmalıdır. Bu şekilde hastalıklara karşı en etkili antibiyotik seçilerek gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçilmelidir.

Et, gıda patojenleri açısından önemli bir vektördür. Özellikle hijyenik koşulları yeterli olmayan kesimhanelerden temin edilen etlerin çeşitli gıda patojenleri ile kontamine olması muhtemeldir. Bu kontaminasyonun önlenmesi için kesimhane koşulları ve gıda hazırlama birimlerinde çalışan kişilerin personel hijyenine dikkat etmesi gerekir.

Bu veriler doğrultusunda, sığır karkaslarının stafilokokal gıda intoksikasyonları açısından potansiyel risk taşıyabileceği, bu nedenle de halk sağlığının korunması için et üretiminin tüm aşamalarında HACCP ve GMP gibi sistemlerin etkin bir şekilde uygulanmasının önemli olacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca tez çalışmasının amaçlarından biri olan yeni tanımlanan toksin genlerinin tespiti, bu toksinlerin de gıda intoksikasyonlarında rol alabileceğini göstermiştir.

ÖZET

Sığır Karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un Varlığı, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Dirençliliğinin Belirlenmesi

Bu çalışma, sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı ile izolatların enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliğini saptamak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Haziran 2011 ve Mayıs 2012 tarihleri arasında Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahada kesilen, 120 adet sığır karkasından alınan örnekler materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler steril bir şablon ile işaretlenen but, kavram ve döş bölgerinden (10x10 cm^2, toplam 300 cm^2) sünger swap tekniği ile alınmıştır. Alınan örnekler öncelikle fenotipik olarak koagulaz-pozitif stafilokok ve *S. aureus* yönünden analiz edilmiştir. Fenotipik yönden *S. aureus* olarak saptanan suşlar PCR tekniği ile doğrulanmış, PCR yöntemiyle enterotoksijenik özellikleri ve *mecA* geninin varlığı araştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucu, 120 sığır karkas örneğinin 32'si (% 26,6) koagulaz pozitif stafilokok ve 15'i (% 12,5) *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur. Çalışmada izole edilen toplam 70 adet koagulaz-pozitif stafilokok izolatından 22'si fenotipik testler sonucu *S. aureus* olarak belirlenmiştir. Bu izolatların tümü, PCR tekniğinde *S. aureus* olarak doğrulanmıştır. *S. aureus* izolatlarının hiçbirinde *mecA* geni saptanamazken, 19'unun (% 86,3) enterotoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Enterotoksijenik izolatlardan 8'inin (% 36,3) *seh*, 5'inin (% 22,7) *sea*, 2'sinin (% 9) *seg+sei*, 1'inin (% 4,5) *sei*, 1'inin (% 4,5) *sed+sej*, 1'inin (% 4,5) *sea+tst* ve 1'ininde (% 4,5) *tst* tipi enterotoksin genine sahip olduğu saptanmıştır.

Çalışma kapsamında yapılan antibiyotik dirençlilik testleri sonucunda *S. aureus* izolatlarından % 72,7'sının ampisiline, % 54,5'inin tetrasikline, % 40,9'unun eritromisine ve % 22,7'sinin sülfametaksazol-trimetoprim'e yüksek oranda dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu antibiyotikleri oksasilin % 18,1, sefoksitin % 13,6, kloramfenikol % 9 ve gentamisin % 4,5 ile takip etmiştir. İzolatların tamamı ise vankomisine duyarlı bulunmuştur.

Sonuç olarak, sığır karkasları kesim sonrası % 12,5 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine bulunmuştur. Başlangıç kontaminasyon düzeyi düşük olsa da izolatların % 86.3'ünün enterotoksijenik özellikte olması halk sağlığı açısından önemlidir. Ayrıca izolatlardan bazılarının klasik enterotoksinlerin yanı sıra, yeni tanımlanan enterotoksin genlerine sahip olmaları da önemlidir. Yine izolatların çoğu bir ve/veya birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde *mecA* geni bulunmamasına rağmen, metisilin duyarlılığının belirlenmesinde kullanılan oksasilin ve sefoksitin gibi antibiyotiklere karşı dirençli suşların tespit edilmiş olması önemlidir. Bu nedenle hijyenik sığır eti üretimi ve halk sağlığının korunması amacıyla HACCP sistemi etkin bir şekilde uygulanmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal direnç, Stafilokokal enterotoksin, Sığır karkas, *S. aureus.*

SUMMARY

Occurrence, Characterzation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* on Beef Carcasses

The objectives of this study were, to determine the incidence, enterotoxigenic properties and antimicrobial resistance of *S. aureus*. For this purpose, 120 beef carcass samples, obtained from 2 different slaughterhouses in Ankara between June 2011 and May 2012. Samples obtained from three carcass sides (brisket, flank and round) marked with sterile template and sponge swap used to sample on carcass (10x10 cm^2, totaly 300 cm^2). Obtained samples firstly analyzed for phenotypically as coagulase positive staphylococci and *S. aureus*. Then phenotypically determined *S. aureus* isolates confirmed with PCR assay and detected by multiplex PCR for enterotoxin genes and *mecA* genes.

Results of microbiological examinations, coagulase positive staphylococci isolated from 32 (26,6 %) of the 120 beef carcasses samples, 15 (12,5 %) of the 120 beef carcasses samples were confirmed as *S. auerus*. In this study, 22 out of 70 coagulase positive isolates identified as phenotypically *S. aureus*. All of this isolates confirmed with PCR assay. 19 (86,3 %) out of 22 *S. aureus* isolates determined as enteotoxigenic. It was determined that these enterotoxins contained 8 (36,3 %) *seh*, 5 (22,7 %) *sea*, 2 (9 %) *seg+sei*, 1 (4,5 %) *sei*, 1 (4,5 %) *sed+sej*, 1 (4,5 %) *sea+tst*, 1 (4,5 %) *tst* gene distribution, respectively. None of the *S. aureus* isolates contain *mecA* gene. In this study, according to the disc diffusion test results, 72,7 %; 54,5 %; 40,9 %; 22,7 % of *S. aureus* isolates were high level resistant to ampicillin, tetracycline, erythromycin, sulphamethoxazole-trimethoprim, respectively. In addition, 18,1 %; 13;6 %; 9 %; 4,5 % of *S. aureus* isolates were resistant to oxacillin, cefoxitin chloramphenicol and gentamicin, respectively. All of the isolates were sensitive to vancomycin.

Finally, it was found that beef carcasses contaminated with *S. aureus*. Even if first level of contamination is low, enterotoxigenic *S. aureus* level is relatively high. This situation is important for public healthy. Also, isolates contained newly described enterotoxin genes. This results indicated that new types enterotoxin genes could be effective in food intoxication. In this study, isolates were found resistance to one or more antibiotics. None of the *S. aureus* isolates contain *mecA* gene but some of them were identified as resistant to a group of antibiotics like oxacillin and cefoxitin which are used in determining methicilin sensitivity. For public healthy and hygienic meat production HACCP systems would be implemented effectively.

Key Words: Antimicrobial resistance, Beef carcass, Staphylococcal enterotoxin, *S. aureus.*

KAYNAKLAR

ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (2008). Bacterial Agents of Foodborne Illness. *Staphylococcus aureus.* In: *Food Microbiology*, Third Edition, The Royal Society of Chemistry, UK. p.: 252-257.

AKINEDEN, Ö., ANNEMULLER, C., HASSAN, A.A., LAMMLER, C., WOLTER, W. AND ZSCHOCK, M. (2001). Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*., **8:** 959-964.

AKINEDEN, Ö., HASSAN, A.A., SCHNEIDER, E., USLEBER, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats'milk cheese. *Int. J. Food Microbiol*., **124:** 211-216.

ANON. (1996). USDA/FSIS: Federal Register: **61(144):** 38931-38937.

ANON. (2003). ISO (International Standart Office, 6888-1). Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci *(Staphylococcus aureus* and other species).

ANON. (2007). CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSIdocument M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

ANON. (2011). Türk gıda kodeksi mikrobiyolojik kriterler yönetmeliği. Resmi Gazete: 29.12.2011; 28157 (3.Mükerrer). http://www.resmigazete.gov.tr Erişim Tarihi: 17.03.2014.

ANON. (2012). Bazı ülkelere ait yıllık sığır eti üretim miktarları. Livestock Primary Erişim: http://faostat.fao.org/ Erişim tarihi: 04.03.2014.

ANON. (2013). www.tuik.gov.tr Erişim tarihi: 04.03.2014.

ARCURI, E.F., ANGELO, F.F., GUIMARÃES, M.F., TALON, R., BORGES, M.DE.F., LETOY, S., LOISEAU, G., LANGE, C.C., ANDRADE, N.J., MONTET, D. (2010). Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese *in Brazil. J. Food Protect*., **73:** 2225–2231.

ARDIC, 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 Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.*, **130:** 33-40.

AYDIN, A, SUDAGIDAN, M, MURATOGLU, K. (2011). Prevalence of Staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *S. aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *Int. J. Food Microbiol*., **148:** 99-106.

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

BANIA, J., DABROWSKA, A., BYSTRON, J., KORZEKWA, K., CHRZANOWSKA, J., MOLENDA, J. (2006). Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. *Int. J. Food Microbiol*., **108:** 36–41.

BARBER, D.A., MILLER, G.Y., MCNAMARA, P.E. (2003). Models of antimicrobial resistance and food-borne illness: examining assumptions and practical application. *J. Food Protect*., **66:** 700–709.

BENDAHOU, A., ABID, M., BOUTELDOUN, N., CATELEJINE, D., LEBBADI, M. (2009). Enterotoxigenic coagulase positive Staphylococcus in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries.,* **3:** 169–176.

BENNETT, S.D., WALSH, K.A., GOULD, L.H. (2013). Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* United States,1998–2008. *Clin. Infect. Dis.,* **57(3):** 425–33.

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

BERGDOLL M.S., LEE WONG A.C. (2006). Staphylococcal intoxications. In: *Foodborne Infections and Intoxications,* Ed.: Rieman H.P., Cliver D.O. San Diego, California: Academic Press, Elsevier Inc., p. : 523–562.

BERNHEIMER, A. W., SCHWARTZ L. L. (1963). Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol***., 30:** 455.

BERNHEIMER, A. W., AVIGAD, L. S., KIM, K. S.. (1974). Staphylococcal sphingomyelinase (beta hemolysin). *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **236:** 292–306.

BHARGAVA, K., WANG, X., DONABEDIAN, S., ZERVOS, M., DE ROCHA, L., ZHANG, Y. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, MI, USA. *Emerg. Infect. Dis.,* **17:** 1135–1137.

BHATIA, A., ZAHOOR, S. (2007). *Staphylococcus aureus* enterotoxins: A review. *J. Clin. Diagn. Res.,* **1(2):** 188-197.

BOHACH, G.A., FAST, D.J., NELSON, R. D., SCHLIEVERT, P.M. **(**1990). Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. *Crit. Rev. Microbiol*., **17:** 251–272.

BOOST, M.V., WONG, A, HO, J., ODONOGHUE, M. (2013). Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from retail meats in Hong Kong. *Foodborne Pathog. Dis.,* **10:** 705-10.

BOYNUKARA, B., GULHAN, T., ALI SARLI, M., GURTURK, K., SOLMAZ, H. (2008). Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. *Int. J. Food Microbiol*., **125:** 209 – 211.

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

CHAMBERS, H.F. (1997). Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin. Microbiol*. Rev., **10:** 781–791.

CLEMENTS, M.O., FOSTER S.J. (1999). Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*., **7:** 458–462.

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. Intel.,* **26:** 574-575.

DE BOER E., ZWARTKRUIS-NAHUIS J.T.M., WIT B., HUIJSDENS X.W., DE NEELING A.J., BOSCH T., VAN OOSTREM R.A.A., VILA A., HEUVELINK A.E. (2009). Prevalence of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. *Int. J. Food Microbiol.,* **134:** 52-56.

DESMARCHELIER, P.M., HIGGS, G.M., MILLS, L., SULLIVAN, A.M., VANDERLINDE, P.B. (1999). Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. *Int. J. Food Microbiol*., **47:** 221–229.

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

DINGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLIEVERT, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.,* **13(1):** 16-34.

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* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.,* **19:** 9-14.

DOYLE, M.E., HARTMANN, F.A., LEE WONG, A.C. (2012). Methicillin-resistant staphylococci: implications for our food supply? *Anim. Health. Res. Rev.,* **13:** 157-80.

EROL İ., İŞERİ O. (2004). Stafilokokal enterotoksinler. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **51:** 239-245.

EROL, İ. (2007). Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Ankara Pozitif Matbaacılık.

ERTAS, N., GONULALAN, Z., YILDIRIM, Y., KUM, E. (2010). Detection of *Staphylococcus aureus* enterotox ins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *Int. J. Food Microbiol.,* **142(1–2):** 74–77.

FAPRI (2012). World Livestock: FAPRI-ISU 2011 Agricultural Outlook, http://www.fapri.iastate.edu/outlook/2011/tables/6_livestock.pdf. Erişim Tarihi: 04.03.2014

FLEISCHER, B., SCHREZENMEIER H. (1988). T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for majör histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J. Exp. Med.,* **167:** 1697–1707.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L., HOLDEN, M.T., LINDSAY, H. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.,* **11:** 595-603.

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

GUCUKOGLU, A., KEVENK, T.O., UYANIK, T., ÇADIRCI, O., TERZI, G., ALISARLI, M. (2012). Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. *J. Food Sci.*, **77:** 620-623.

GUNDOGAN, N., CITAK, S., YUCEL, N., DEVREN, A. (2005). A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Sci*., **69:** 807-810.

GUNDOGAN, N., CITAK, S., TURAN, E. (2006). Slime production, DNAse activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples. *Food Control*, **17:** 389–392.

HANSON, B.M., DRESSLER, A.E., HARPER, .A.L, SCHEIBEL, R.P., WARDYN, S.E., ROBERTS, L.K., KROEGER, J.S., SMITH, T.C. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health,* **4:** 169–174.

HANSSON, M., SAMUELSON, P., GUNNERUSSON, E., STAHL, S. (2001). Surface display on gram positive bacteria. *Comb. Chem. High Throughput Screen*, **4:** 171–184.

HATA, E., KATSUDA, K., KOBAYASHI, H., UCHIDA, I., TANAKA, K., EGUCHI, M. (2010). Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. *J. Clin. Microbiol*., **48:** 2130–2139.

HIRAMATSU, K., ARITAKA, N., HANAKI, H., KAWASAKI, S., HOSODA, Y., HORI, S. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, **350:** 1670-3.

HOLECKOVA, B., HOLODA E., FOTTA M., KALINOCOVA V., GONDOL C., GROLMUS J. (2002). Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann. Agric. Environ. Med.,* **9:** 179–182.

JABLONSKY, L.M., BOHACH, G. (1997). *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* Ed.: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Monteville, T.J. Washington DC: ASM Press, p.: 353–357.

JACKSON, C.R., DAVIS, J.A. BARRETT, J.B. (2013). Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat and humans in Georgia. *J. Clin. Microbiol*., **51(4):** 1199-1207.

JARRAUD, S., COZON, G., VANDENESCH, F.B.M., ETIENNE, J., LINA, G. (1999). Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.*, **37:** 2446–49.

JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. (2005). Staphylococcal Gastroenteritis. In: *Modern Food Microbiology*, Seventh Edition. California: Springer. p. :545-566.

JOHLER, S., TICHACZEK-DISCHINGER, P.S., RAU, J., SIHTO, H.M., LEHNER, A., ADAM, M., STEPHAN, R. (2013). Outbreak of staphylococcal food poisoning due to SEA-producing *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog. Dis.*, **10**: 1–5.

JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASTON, F.E., POLLARD, D.R., KOZEE, K.R (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.,* **29:** 426–430.

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. Emerg. Infect. Dis.,* **8(1):** 82-84.

KAV, K., COL, R., ARDIC, M. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from white-brined Urfa cheese. *J. Food Protect.,* **74:** 1788-1796.

KELMAN, A., SOONG, Y.A., DUPUY, N., SHAFER, D., RICHBOURG, W., JOHNSON, K., BROWN, T., KESTLER, E., LI, Y., ZHENG, J. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from retail ground meats. *J. Food Protect.,* **74:** 1625-1629.

KITAI, S., SHIMIZU, A., KAWANO, J., SATO, E., NAKANO, C., UJI, T., KITAGAWA, H. (2005). Characterization of methicillin-resistant *S. aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *J. Vet. Med. Sci*., **67(1):** 107-110.

LADHANI, S., JOANNOU, C. L., LOCHRIE, D. P., EVANS, R.W., POSTON S.M.. (1999). Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.,* **12:** 224–242.

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

LEONARD, B.A.B., SCHLIEVERT, P.M. **(**1992). Immune cell lethality induced by streptococcal pyrogenic exotoxin A and endotoxin. *Infect. Immun.,* **60:** 3747–3755.

LIM, S.K., NAM, H.M., PARK, H.J., LEE, H.S., CHOI, M.J., JUNG, S.C., LEE, J.Y., KIM, Y.C., SONG, S.W., WEE, S.H. (2010). Prevalence and characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol,*. **20:** 775–778.

LINA, G., BOHACH., G. A., NAIR S. P., HIRAMATSU K., JOUVIN-MARCHE E., MARIUZZA R. (2004). Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.,* **189:** 2334–2336.

LIVERMORE, D. M. (2000). Antibiotic resistance in staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **16:** 3–10.

LOWY, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*., **339(8):** 520-532.

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

MAES, N., MAGDALENA, J., ROTTIERS, S., DE GHELDRE, Y., STRUELENS, M. J. (2002). Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood Cultures. *J. Clin. Microbiol*., **40:** 1514–1517.

MAO, X., HU, J., LIU, X. **(**2010). Epidemiological characteristics of bacterial foodborne disease during the year 2003–2007 in China. *Chin. J. Food Hyg*., **22**: 224 –228.

McCALLUM, N., BERGER-BACHI B., SENN M. M.. (2010). Regulation of an tibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol*., **300:** 118-129.

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. *J. Clin. Microbiol*., **38(3):** 1032-1035.

MILLER, R.D., FUNG, D.Y.C. (1973). Aminoacid requirements for production of enterotoxin-B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.,* **25(5):** 800–806.

MIRAGLIA, D., RANUCCI, D., D'OVIDIO, V., BRANCIARI, R., SEVERINI, M. (2005). Comparison between carcass microbial load recovered swabbing surfaces of different size and using the reference excission method. *Veterinary Research Communications*, **29:** 339–341.

MONDAY, S.R., BOHACH, G.A. (1999). Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol*., **37(10):** 3411-3414.

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:** 3337–3348.

NEMA, V., AGRAWAL, R., KASMBOJ, D. V., GOEL, A. K. AND SINGH, L. (2007). Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *Intl. J. Food Microbiol*., **117:** 29–35.

NITZSCHE, S., ZWEIFEL C., STEPHAN R. (2007). Phenotypic and genotypic traits of *Staphylococcus aureus* strains isolated from pig carcasses. *Vet. Microbiol.,* **120:** 292–299.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA SALANDRA, G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., 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.

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 foods 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., MIONI, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A.P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PIRINO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUAGLIA, 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.

NYACHUBA D. G. (2010). Foodborne illness: is it on the rise? *Nutrition Reviews,* **68 (5):** 257-269.

OGSTON, A. (1882). Micrococcus poisoning. *J. Anat. Physiol*., **17:** 24–58.

OSTYN, A., DE BUYSER, M.L., GUILLIER, F., GROULT, J.; FELIX, B., SALAH, S.; DELMAS, G., HENNEKINNE, J.A. (2010). First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Euro. Surveill*., **15(13):** 19528.

ÖZDEMİR, H., ŞİRELİ, U.T., CAN, Y.H. (2010). Determination of microbial surface contamination on beef carcasses. Archiv für Lebensmittelhygiene, **61 (1):** 27-30.

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

PEPPERELL, R., REID, C.A., SOLANO, S.N., HUTCHISON, M.L., WALTERS, L.D., JOHNSTON, A.M., BUNCIC, S. (2005). Experimental comparison of excision and swabbing microbiological sampling methods for carcasses. *J. Food Protect.,* **68:** 2163–2168.

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

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

PETERSEN, A., STEGGER, M., HELTBERG, O., CHRISTENSEN, J., ZEUTHEN, A., KNUDSEN, L.K., URTH, T., SORUM, M., SCHOULS, L., LARSEN, J., SKOV, R., LARSEN, A.R. (2013) . Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying thenovel mecC gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir withtransmission to humans. *Clin. Microbiol. Infect*., **19:** 16–22.

PETTERSSON, H., FORSBERG, G. (2002). Staphylococcal enterotoxin H contrasts closely related enterotoxins in species reactivity. *Immunology*, **106:** 71-79.

PHILIPS, D., JORDAN, D., MORRIS, S., JENSON, I., SUMNER, J. (2006). A national survey of the microbiological quality of beef carcasses and frozen boneless beef in Australia. *J. Food Protect.,* **69(5):** 1113-1117.

PHILIPS, D., SUMNER, J., ALEXANDER, J.F., DUTTON, K.M. (2001). Microbiological quality of Australian beef. *J. Food Protect.,* **64(5):** 692-696.

PREVOST, G., COUPPIE, P., PREVOST, P., GAYET, S., PETIAU, P., CRIBIER B., MONTEIL, H., PIEMONT Y. (1995a). Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J. Med. Microbiol*., **42:** 237–245.

PREVOST, G., CRIBIER, B., COUPPIE, P., PETIAU, P., SUPERSAC, G., BARBANCON, V.F., MONTEIL, H., PIEMONT, Y. (1995b). 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:** 4121–4129.

PU, S., HAN, F., GE, B. (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.,* **75(1):** 265-267.

RAO, S. (2006). Coagulase test. Erişim: http://www.microrao.com/micronotes/coagulase.pdf Erişim tarihi: 04.03.2014.

REACHER, M.H., SHAH, A., LIVERMORE, D.M.,WALE, M.C., GRAHAM, C., JOHNSON, A.P.,HEINE, H., MONNICKENDOM, M.A., BARKER, K.F., JAMES, D., GEORGE, R.C. (2000). Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *Br. Med. J.*, **320:** 213–216.

RHEE, C.H., WOO, G.J. (2010). Emergence and characterization of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Food Protect*., **73:** 2285–2290.

ROSEC, J.P., GIGAUD, O. (2002). Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol*., **77 (1-2):** 61-70.

SCHLEGELOVA, J., NAPRAVNIKOVA, E., DENDIS, M., HORVATH, R., BENEDIK, J., BABAK, V. (2004). Beef carcass contamination in slaughterhouse and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates of selected microbial species. *Meat Sci*., **66:** 557–565.

SCHMID, D., FRETZ, R., WINTER, P., MANN, M., HAEGER, G., STAEGER, A., RUPPITSCH, W., LADSTAETTER, J., MAYER, N., DE MARTIN, A., ALLERBERGER, F. (2009). Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **121:** 125–131.

SCHNEEWIND, O., MISSIAKAS, D. (2009). *Staphylococcus aureus* and related Staphylococci.. In: *Practical Handbook of Microbiology*. Ed.: Goldman, E., Green, L.H.. USA: Crc press. p.: 275-294.

SENTANDREU, M. A., COULIS, G., OUALI, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci. Tech.*, **13:** 400-421.

SEO, K.S., BOHACH, G.A. (2007). Foodborne Pathogenic Bacteria. *Staphylococcus aureus*. In: *Food Microbiology*: *Fundamentals and Frontiers*, Third Edition. Ed: Doyle, M.P. Beuchat, L.R. Washington: ASM Press. p.: 493-518.

SHAFER, W.M., IANDOLO, J.J. (1978). Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin *B. Infect. Immun.*, **20:** 273–278.

SHAHRAZ, F., DADKHAH, H., KHAKSAR, R., MAHMOUDZADEH, M., HOSSEINI, H., KAMRAN, M., BOURKE, P. (2012). Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of mecA gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. *Meat Sci*., **90(3):** 759–763.

SHALITA, Z., HERTMAN, I., SAND, S. (1977). Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **129:** 317–325.

SHORR, A.F. (2007). Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin. Infect. Dis.*, **45:** 171–176.

SUDAGIDAN, M., AYDIN, A. (2010). Virulence properties of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* food isolates encoding Panton-Valentine Leukocidin gene. *Int. J. Food Microbiol*., **138:** 287–291.

SUNDSTROM, M., ABRAHMSEN, L., ANTONSSON, P., MEHINDATE, K., MOURAD, W., DOHLSTEN, M. (1996). The crystal structure of staphylococcal enterotoxin type D reveals Zn -mediated homodimerization. *Embo J.*, **15:** 6832–6840.

SUTHERLAND, J., VARNAM, A. (2002). Enterotoxin-producing *Staphylococcus*, Shigella, Yersinia, Vibrio, Aeromonas and Plesiomonas. In: *Foodborne Pathogens.* Ed:. Blackburn, C.W., McClure, P.J. Washington, D.C.: CRC press. p.: 384-415.

TODAR, K. (2005). *Staphylococcus*. Erişim: http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html. Erişim tarihi: 24.02.2014.

TREMAINE, M.T., BROCKMAN, D.K., BETLEY, M.J. (1993). Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *B. Infect. Immun*., **61:** 356-359.

TRZCINSKI, K., COOPER, B.S., HRYNIEWICZ, W., DOWSON, C.G. (2000). Expressionof resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.,* **45:** 763–70.

TÜRKYILMAZ, S., TEKBIYIK, S., ORYASIN, E., BOZDOGAN, B. (2010). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Zoonoses Public Hlth.*, **57:** 197–203.

UDO, E.E., AL-BUSTAN, M.A., JACOB, L.E., CHUGH, T.D. (2009). 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.

VAN LOO, I.H.M., DIEDEREN, B.M.W., SAVELKOUL, P.H.M., WOUDENBERG, J.H.C., ROOSENDAAL, R., VAN BELKUM, A., TOOM, N.L., VERHULST, C., VAN KEULEN, PH.J., KLUYTMANS, A.A.J.W. (2007). Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat products, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis*., **13:** 1753-1755.

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

VANDERLINDE, P.B., SHAY, B., MURRAY, J. (1998). Microbiological Quality of Australian Beef Carcass Meat and Frozen Bulk Packed Beef. *Int. J. Food Microbiol*., **61:** 437-443.

WARE, L.M., KAIN, M.L.. SOFOS, J.N., BELK, K.E., SMITH, G.C. (1999). Comparison of sponging and excising as sampling procedures for microbiological analysis of fresh beef-carcass tissue. *J. Food Protect.,* **11:** 1255-1259.

WEESE, J.S., AVERY, B.P., SMITH, R.J.R. (2010). Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. *Lett. Appl. Microbiol*., **51:** 338–342.

WITTE, W., CUNY, C., STROMMENGER, B., BRAULKE, C., HEUCK, D. (2004). Emergence of community-acquired MRSA in Germany. *Eurosurveillance,* **9:** 16–18.

YAN, X., WANG, B., TAO X., HU, Q., CUI, Z., ZHANG, J., LIN, Y., YOU, Y., SHI, X., GRUNDMANN, H. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains

associated with food poisoning in Shenzhen, China. *Appl. Environ. Microbiol.,* **78:** 6637-42.

YAYLAK, E., TAŞKIN, T., KOYUBENBE, N., KOCA, Y. (2010). İzmir İli Ödemiş İlçesinde Kırmızı Et Tüketim Davranışlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Hayvansal Üretim,* **51(1):** 21-30.

YILMAZ, İ., GÜMÜŞ, T. (2008). Sığır karkaslarının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, Erzurum s.: 525-528.

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 enterotox in determinant (sej). *Fems Microbiol. Lett.,* **168:** 227–233.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Erhan
Soyadı : KEYVAN
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresi : Remzi Oğuz Arık Mah. Kuveyt Cad. 26/6 Çankaya Ankara
Telefon : 0532 353 37 82
e-mail : erhankeyvan@yahoo.com

II- Eğitim Durumu

İlkokul : 1992-1997 Sunguroğlu İlkokulu
Ortaokul : 1997-2000 Dr. Sedat Dr. Melahat Baran İlköğretim Okulu
Lise : 2000-2002 Sungurlu Lisesi
Üniversite : 2003-2008 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doktora : 2008-2014 Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD
Yabancı Dil : İngilizce

III- Ünvanları

: 2008 Veteriner Hekim
: 2008 Araştırma Görevlisi (MAKÜ)
: 2009 Araştırma Görevlisi (Ankara Üniversitesi)

IV- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

1. **Keyvan, E.,** Özdemir, H. (2010). Prediktif Mikrobiyoloji ve Gıda Endüstrisinde Önemi. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 8 (2): 11-25.

2. **Keyvan, E.** Sığır Karkaslarında Post-Mortem Değişiklikler (2011). Vet. Hekim Der. Derg. 81 (2): 43-46.

3. **Keyvan, E.** (2011). Broyler Piliç Kesimhanelerinde Hayvan Refahı Uygulamaları. Veteriner Tavukçuluk Deneği Mektup Ankara. 9(3),18-20.

4. Kursun, O., Kırdar, S. S., **Keyvan, E.,** Guner, A.. (2011). Microbiological quality of white pickled cheese produced in small plants in Burdur. Turkey Journal of Food, Agriculture & Environment, 9 (2): 110-112.

5. **Keyvan, E.** Hazır mıyız? Kök hücreden et (2011). Veteriner Hekimler Derneği Bülteni. Sayı:3-4, Sayfa:13.

6. **Keyvan, E.** Yanıkara Hastalığı. (2013). Köy-KoopHaber. 20(2): 18.

Ulusal Bildiri

1. Kurşun O., Kırdar S.S., Kasımoglu A., **Keyvan, E.** (2009). Presence of *Listeria monocytogenes* in Keş Cheese. 3. Ulusal Gıda Hijyeni Kongresi, 294-296.

2. Kurşun, O., Kırdar, S.S., **Keyvan, E.** (2009). Akdeniz Bölgesindeki Bazı Geleneksel Peynirilerde Brucella spp. Saptanması. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu.

3. Kurşun, O., Kırdar, S.S., **Keyvan, E.** (2009). Burdur Şiş'inde *E. coli 0157: H7* Varlığının Belirlenmesi. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu.

4. Kurşun, O., Kırdar, S.S., **Keyvan, E.** (2009).Keş Peynirierinde E. coli 0157:H7 Varlığının Belirlenmesi. II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu.

5. **Keyvan, E.,** Kul, B. Ç., Bilgen, N., Çil, G. İ., ŞİRELİ, U. T. (2013). Farklı Tip Et Ürünlerinde PCR Yöntemi ile Tür Tayini 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi. s.: 175-176

Uluslararası Bildiri

1. Coşkun, S., Altanlar, N., **Keyvan, E.** (2012). Comparison of methods for detecton of plasmid medited AmpC beta lactamases in clinical isolates of Escherichia Coli and Klebsiella pneumonia. ISOPS 10 th International Symposium on Pharmaceutical Sciences. June 26-29 2012 Ankara/Turkey.

V- Bilimsel Etkinlikler

Projeler

1. Ozdemir, H., **Keyvan, E.** (2012). Sığır, Koyun ve Piliç Etlerinde *Staphylococcus aureus*'un Varlığı ve Moleküler Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi BAP projesi. 12A3338002

Seminerleri:

1. Prediktif Mikrobiyoloji ve Gıda Endüstrisinde Önemi
2. Sığır Karkaslarında Postmortem Değişiklikler