



**AFYONKARAHİSAR’DA SATIŞA SUNULAN
KAYMAKLARDAN İZOLE EDİLEN
Staphylococcus aureus SUŞLARINDA
METİSİLİN VE PANTON-VALENTINE
LÖKOSİDİN GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aliye HORASAN YAKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
DANIŞMAN: Prof. Dr. Esra ŞEKER**

**Ağustos, 2021
AFYONKARAHİSAR**

T.C.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AFYONKARAHİSAR'DA SATIŞA SUNULAN
KAYMAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus
aureus* SUŞLARINDA METİSİLİN VE PANTON-
VALENTINE LÖKOSİDİN GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim Aliye HORASAN YAKAN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Esra ŞEKER**

Tez No: 2021-

AFYONKARAHİSAR

TEZ KABUL ve ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ında** Aliye HORASAN YAKAN tarafından hazırlanan "Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Kaymaklardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin ve Panton-Valentine Lökosidin Genlerinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması Afyon Kocatepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca .../.../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği/oy çokluğu** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan
Prof. Dr. Esra ŞEKER

Üye
Prof. Dr. Beytullah KENAR

Üye
Dr. Öğr. Ü. Merih ŞİMŞEK

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla
onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

...../...../.....

İmza

Öğrenci Adı-Soyadı

ÖZET

AFYONKARAHİSAR'DA SATIŞA SUNULAN KAYMAKLARDAN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARINDA METİSİLİN VE PANTON-VALENTINE LÖKOSİDİN GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da üretilen ve satışa sunulan Afyon kaymaklarından izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin ve Panton-Valentine lökosidin genlerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, 2019-2020 yılları arasında Afyonkarahisar merkez, ilçe ve köylerindeki halk pazarlarında satılan toplam 110 adet kaymak örneği toplandı. Kaymaklardan *S. aureus* izolasyonu konvansiyonel kültür yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının doğrulaması PZR ile yapıldı. Ayrıca suşlarda *mecA* ve *pvl* genlerinin varlığı da PZR ile araştırıldı. Çalışmada 110 adet kaymak örneğinin 14'ünden standart kültür yöntemiyle *S. aureus* izole edilirken, bunlardan 13'ü (%11,8) PZR ile *S. aureus* olarak tiplendirildi. Toplam 13 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *mecA* ve *pvl* genleri bulunamadı.

Anahtar Kelimeler: Kaymak, Metisilin, *mecA*, Panton-Valentine Lökositin, *pvl*, *Staphylococcus aureus*

SUMMARY

INVESTIGATION OF METHICILLIN AND PANTON-VALENTINE LEUKOCIDIN GENES IN *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM CLOTTED CREAM SOLD IN AFYONKARAHİSAR

This study aimed to investigate the methicillin and Panton-Valentine leukocisin genes in *S. aureus* strains isolated from Afyon clotted cream samples produced and sold in Afyonkarahisar. For this purpose, a total of 110 clotted cream samples sold in public bazaars located center, center town and villages of Afyonkarahisar were collected between 2019-2020. The isolation of *S. aureus* from clotted cream samples was achieved by conventional cultural methods. The confirmation of *S. aureus* strains isolated from samples was made by PCR. In addition, the presence of *mecA* and *pvl* genes in strains was investigated by PCR. In this study while *S. aureus* was isolated from 14 of 110 clotted cream samples by standard cultural methods, 13 (11.8%) of 110 samples were typed to be *S. aureus* by PCR. The *mecA* and *pvl* genes were found in none of the 13 *S. aureus* strains.

Key words: Clotted cream, methicillin, *mecA*, Panton-Valentine Leukocidin, *pvl*, *Staphylococcus aureus*

ÖNSÖZ

Afyon kaymağı genellikle manda sütünden yapılmakla birlikte son dönemlerde inek sütünden de yapılmaya başlanmıştır. Kaymak yapımında üretimin ekonomik olabilmesi için süt yağı oranının yüksek olması ile birlikte beğeni ile tüketilmesi için beyaz olması gerekmektedir. Süt yağ oranı %9,27 ve süt yağı rengi beyaz olduğu için manda sütünden yapılan kaymak tüketici açısından daha çok tercih edilmektedir. Türk Gıda Kodeksi'ne göre kaymak; içerisinde en az %60 oranında süt yağı bulunan ve dışarıdan herhangi bir katkı maddesi katılmadan özel yöntemlerle yapılıp şekil verilen krema olarak tanımlanmaktadır.

Sunulan çalışmanın temel amacı; örneklemenin yapıldığı Afyonkarahisar'da ev şartlarında manda veya inek sütlerinden üretimi yapılan ve halk pazarlarında satışa sunulan Afyon kaymaklarından *Staphylococcus aureus* izolasyonu ve izole edilen suşlarda metisilin ve Panton-Valentine lökositidin toksin genlerinin varlığının genotipik olarak araştırılmasıdır.

“Afyonkarahisar’da Satışa Sunulan Kaymaklardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin ve Panton-Valentine Lökositidin Genlerinin Araştırılması” konulu yüksek lisans tez çalışmamda, bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan danışmanım Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Dalı Başkanı Prof. Dr. Esra ŞEKER olmak üzere, Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Beytullah KENAR ve Selçuk Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU’na teşekkür ederim. Ayrıca laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Oğuz Kaan TÜREDİ ve saha çalışmalarında desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Suat YAKAN’a teşekkür ederim. Son olarak beni hep destekleyen annem ve babama teşekkür ederim.

Aliye HORASAN YAKAN

Afyonkarahisar

2021

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ÖNSÖZ SAYFASI	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER	XI
ÇİZELGELER	XII
RESİMLER	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Staphylococcus</i>	4
1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
1.1.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Kültür, Üreme Özellikleri ve İdentifikasyonu	8
1.1.1.2. Virulans Faktörleri	9
1.1.1.2.1. Adezinler	10
1.1.1.2.2. Hücre Duvarı ve Kapsül	11
1.1.1.2.3. Biofilm Oluşumu İle İlgili Yüzey Bileşimi	12
1.1.1.2.4. Ekstraselüler Protein Toksini	13
1.1.1.2.5. Enzimler	17
1.1.2. Metisilin Direnci	20
2. MATERYAL ve METOT	23
2.1. Materyal	23
2.1.1. Kaymak Örneklerinin Toplanması	23
2.1.2. Besiyerleri, Solüsyonlar, Çözeltiler, İdentifikasyon Kitleri	25
2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar	27
2.2. Metot	27
2.2.1. Örneklerden <i>Staphylococcus aureus</i> 'un İzolasyon ve İdentifikasyonu	27
2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	28

2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu	28
2.2.2.2. Amplifikasyon Koşulları	28
3. BULGULAR	31
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	31
3.2. PZR Bulguları	31
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
6. KAYNAKLAR	38
7. EKLER	45
7.1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	46
8. ÖZGEÇMİŞ	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

α : Alfa

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece

μg : Mikrogram

cAMP: Siklik adenzin monofosfat

DNaz: Deoksiribonükleaz

ET-A: Epidermolitik Toksin A

ET-B: Epidermolitik Toksin B

F: Fast

Fbp: Fibrinojen Bağlayan Protein

Fc: Kristalize Fragment

fem: Metisilin direncinin ekspresyonu için gerekli faktörler, factors essential for the expression of methicillin resistance

g: Gram

HK-MRSA: Hastane kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

Ig: İmmunoglobulin

IL: İnterlökin

kDa: Kilo dalton

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokoklar

Kob: Koloni oluşturan birim

KPS: Koagülaz Pozitif Stafilokoklar

LA-MRSA: Çiftlik hayvanları kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus*

Log: Logaritma

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

MSCRAMM: Microbial Surface Proteins Recognizing Adhesive Matrix Molecules

NaCl: Sodyum Klorür

NAGA: N-asetilglukozamin

NAMA: N-asetilmuramik asit

QS: Quorum Sensing

PBP: Penisilin bağlayan protein

PI-PLC: Fosfatidil inozitol-spesifik fosfolipaz C

PMN: Polimorf nükleer lökosit

PVL: Panton-Valentine Lökosidin

PYR: L-pirolidonil aminopeptidaz

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

S: Slow

SCCmec: Stafilokokal kromozomal kaset mec

SSS: Stafilokokal deri sendromu

TGK: Türk Gıda Kodeksi

TK-MRSA: Toplum kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

TSSS: Stafilokokal Toksik  ok Sendromu

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

U: Unit

ŞEKİLLER

SAYFA

Şekil 1.1. PVL'nin doku nekrozuna nasıl aracılık ettiğini gösteren model

17



ÇİZELGELER

	SAYFA
Çizelge 1.1. <i>S. aureus</i> 'un tarihçesinde önemli gelişmeler	6
Çizelge 1.2. <i>Staphylococcus</i> türlerinin sınıflandırılması	7
Çizelge 1.3. Hayvanlarda <i>S. aureus</i> etiyolojili bazı enfeksiyonlar	8
Çizelge 1.4. Stafilocokların virulans faktörleri	19
Çizelge 1.5. <i>S. aureus</i> tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler	20
Çizelge 1.6. Stafilocoklarda metisiline direnç mekanizmaları	21
Çizelge 2.1. Kaymak örneklerinin toplandığı yerler, örneklerin orijini ve üretim tipi	23
Çizelge 2.2. Kullanılan primerlere ait olinükleotid sekansları, bant büyüklükleri ve referansları	29
Çizelge 2.3. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (16s rDNA ve <i>mecA</i>)	29
Çizelge 2.4. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (<i>pvl</i>)	30
Çizelge 2.5. 16S rDNA, <i>mecA</i> , <i>pvl</i> genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları	30

RESİMLER

	SAYFA
Resim 3.1. 16S rDNA ve <i>mecA</i> genlerine ait PZR bulguları	32
Resim 3.2. <i>pvl</i> geninin araştırıldığı jel görüntüsü	32



1. GİRİŞ

Süt; insanların gündelik ihtiyacı olan protein, yağ, karbonhidrat, mineral gibi besin maddelerini yeterli ve dengeli şekilde içeren gıda maddesi olarak tanımlanabilir. Sütün en önemli bileşenlerinden biri süt yağıdır. Süt yağının özgül ağırlığının (0,931 g/ml) sıvı kısmından (1,034 g/ml) daha düşük olması sebebiyle, süt bir süre bekletildiği zaman sütün yağlı kısmı yukarıya doğru çıkarak yüzeyde toplanmaya başlar ve kürecikler halinde bulunan yağlar birleşerek kütleler oluşturur. Yüzeyde bulunan tabaka yağca zengin hale gelerek süt yağından oluşan “kaymak tabakası” adı verilen gıdayı oluşturur. Kaymak yağ oranı yüksek ve kuru madde bakımından zengin bir gıda maddesidir (Akarca ve Tomar, 2018).

En az %60 süt yağı içeren krema olan kaymak, geleneksel üretimde sütün tekniğine uygun olarak kaynatılıp soğutulması sonucu elde edilen süt ürünü olup hafif asidik tatta olup kremsi yapıda olan süt ürünüdür. Geleneksel olarak evlerde üretimi yapılan manda kaymağı manda sütünden üretilmektedir. Türkiye’de asıl olarak Afyonkarahisar’da ve çevresinde ayrıca Orta Anadolu’da manda sütünden yapılırken, Afyonkarahisar’ın doğusunda inek sütünden de yapılmaktadır (Kocatürk vd., 2019; Albay vd., 2021). Türk Gıda Kodeksi (TGK) Yönetmeliği Krema ve Kaymak Tebliği’ne (TGK, 2003) göre kaymak; içerisinde en az %60 oranında süt yağı bulunan ve dışarıdan herhangi bir katkı maddesi katılmadan özel yöntemlerle yapılp şekil verilen krema olarak tanımlamaktadır. Kremalar içerdikleri süt yağı oranlarına göre;

-ağırlıkça en az %10 süt yağı içeren krema “az yağlı krema”

-ağırlıkça en az %18 süt yağı içeren krema “krema”

-ağırlıkça en az %45 süt yağı içeren krema “tam yağlı krema” adı altında piyasada bulunmaktadır (TGK, 2003).

Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak tebliğine göre kaymağın “Afyon Kaymağı” olarak tanımlanması için manda sütünden ve tekniğine göre üretilmesi

gerekmektedir (TGK, 2003). Geleneksel kaymak yapımında taze manda sütü ya da yağ oranı krema eklenmesiyle yükseltilmiş inek sütü kullanılmaktadır. Sütler sağılır sağılmaz çift katlı tülbent süzgeçler yardımıyla alüminyum veya kalaylı bakır tavalara süzülür. Süzülen sütler öncelikle 70-75 °C'ye kadar ön ısıtmaya tabi tutulur. Ön ısıtmadan sonra eğer kaymak inek sütünden elde ediliyorsa %10 oranında taze krema ilave edilmesi gerekir. Manda sütü kullanılması durumunda ise krema eklemeye gerek yoktur. Ön ısıtmayı takiben tavalardaki sütler sürekli karıştırılarak 90-95 °C'ye kadar ısıtılmalı ve ısıtma işlemine 4-5 saat devam edilmelidir. İşlemin sonunda sütler geniş tabanlı ve 8-10 cm yüksekliğine sahip tavalara belirli yükseklikten aktararak köpük oluşumu sağlanmalı ve gözenekli yapıda olması sağlanmalıdır. Soğuk bir alana alınan tavalar 40-45 °C'ye kadar soğutulmaya bırakılmalıdır. Soğutma sonrası sütler tekrar 70-75 °C'ye kadar tekrar ısıtılarak sonrasında 24 saat soğuk odaya alınarak kaymak tabakasının oluşumu sağlanmalıdır. Bu kaymak tabakasının sertleşmesi için üzerlerine buz parçaları konularak sertleşmesi sağlanmakta ve bıçak yardımıyla kesilerek ve paketlenerek tüketime sunulmaktadır (Kurt ve Özdemir, 1988).

Kaymak; yağca zengin süt ürünü olup ve üretiminde yeterli hijyen ve sanitasyon kurallarına uyulmaması, çapraz bulaşmaların önüne geçilememesi, ambalajlama ve depolama koşullarına uyulmaması durumunda kolaylıkla bozulmaktadır. Isı işlemi uygulaması sonrasında mikroflorası azaltılmış olan süt ve süt ürünleri *Staphylococcus aureus* ile kontaminasyona uğramış besinler, Stafilokok intoksikasyonun oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Akarca ve Tomar, 2018). Bu nedenle *S. aureus* kaymak gibi ürünlerde (pH, su dengesi vb.) uygun koşullarda çok hızlı gelişebilmekte ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturabilmektedir (Alişarlı vd., 2003).

S. aureus tarafından üretilen penisilinaz enzimine dirençli yarı sentetik penisilin türevi bir antibiyotik olan metisilin 1959 yılında üretilerek klinik kullanıma sunulmuş, ancak 1961 yılında İngiltere'de ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşu bildirilmiştir (Jevons, 1961; Lowy, 2003). O tarihten günümüze MRSA hastanelerde, toplumda ve hayvancılıkta zamanla artan önemde bir patojendir.

MRSA epidemiyolojik gruplarını ayırt etmek için hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA), toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA), çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA (LA-MRSA, Livestock-Associated MRSA) olarak gruplandırma yapılmıştır. İlk olarak 1961 yılında HK-MRSA tanımlanmış ve daha sonra MRSA suşları topluma ve sonraları sağlık tesislerine yayılmıştır. Bin dokuz yüz doksan yılında ise TK-MRSA ve LA-MRSA suşları tanımlanmıştır (Wu vd., 2019) .

Panton-Valentine Lökositin (*PVL*); lökosit yıkımına ve doku nekrozuna sebep olan bir toksin olup metisiline dirençli *S. aureus* son yıllarda toplum kaynaklı enfeksiyonlarda önemli halk sağlığı açısından sorun olmaya başlamıştır (Lina vd., 1999; Lo ve Wang, 2011; Tuna vd., 2020). Ciddi sorunlara neden olan *pvl* biribiri ile sinerjik etki gösteren iki komponentli toksin olup konak lökositlerin membranlarında porlar oluşturarak bu hücrelerin erimesine neden olurlar. PVL sentezleyen suşlar tarafından oluşan enfeksiyonlar çok şiddetli seyretmekte ve akut nekrotizan pnömonilerde olduğu gibi ölümle de sonuçlanabilmektedir. Özellikle toplum kökenli suşlar tarafından sentezlenmekle birlikte yapılan çalışmalar PVL pozitif *S. aureus* suşlarının hastane kaynaklı salgınlara da neden olduğunu göstermektedir (Lina vd., 1999; Peacock, 2006; Lo ve Wang, 2011).

1.1. *Staphylococcus*

Staphylococcus terimi mikroskop altındaki karakteristik üzüm salkımı şeklindeki görünümünden dolayı Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen “staphyle” sözcüğünden türetilmiştir. Etkenler 1878 yılında Robert Koch tarafından ilk kez ışıık mikroskobunda görüntülenmiş ve ardından etkenlerin ilk defa sıvı besiyerinde üretilmesi işlemi 1880 yılında Louis Pasteur tarafından başarılmıştır. *Staphylococcus* terimi ise ilk kez 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından kullanılmıştır. Friedrich Julius Rosenbach ise 1884 yılında, irinli yaralardan kültür olarak elde ettiği kolonilerin altın sarısı renginden dolayı *S. aureus* ismini kullanmıştır. Bu aşamalardan sonra yapılan çalışmalarda yoğun olarak *S. aureus*’un patojen olmayan *Staphylococcus* türlerinden ayırma işlemlerine başlanmış olup, 1930

yılından itibaren koagülaz reaksiyonu *S. aureus*'un diğer türlerden ayırımında kullanılmaya başlanmıştır. Diğer Stafilokok türlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar 1960'lı yıllarda Baird Parker tarafından başlatılmıştır. Koagulaz negatif *Staphylococcus* (KNS) türleri 1970'li yılların ortalarına kadar patojen sınıflar içerisinde değerlendirilmezken, vakaların artmasıyla KNS türlerinin izole edilmesinin ardından araştırmalar bu yöne doğru kaydırılmıştır (Rosenbach, 1884; Kloos ve Bannerman, 1999; Cookson vd., 2003; Akan, 2006; Ilgaz vd., 2011).

Staphylococcus türleri 16S rRNA sekans analizine göre, taksonomik olarak Staphylococcaceae familyası içerisinde yer alır (Franklin, 1998; Fong ve Kolia, 2003). *Staphylococcus* cinsi içindeki tür ve alt türler zamanla değişkenlik göstermiştir. Mikrobiyolojinin temel kaynaklardan biri olan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology adlı kaynağa göre bu cins altında *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus aureus* subspecies *anaerobius*, *Staphylococcus aureus* subspecies *aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis* subspecies *capitis*, *Staphylococcus capitis* subspecies *ureolyticus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus caseolyticus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus cohnii* subspecies *cohnii*, *Staphylococcus cohnii* subspecies *ureolyticum*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus muscae*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus piscifermentans*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans*, *Staphylococcus schleiferi* subspecies *schleiferi*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus vitulus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus* olmak üzere 36 tür ve alt tür bulunmaktadır. *S. aureus*'un zaman içerisindeki tarihsel gelişimi Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1: *S.aureus*'un tarihçesinde önemli gelişmeler (Hazımoğlu, 2011)

Tarih	Olay	Kaynak
1881	İnsan irininde üzüm salkımı şeklinde görünen mikroorganizma identifiye edildi	Ogston, 1881
1884	Rosenbach Stafilocokları pigment özelliğine göre gruplandırıldı	Rosenbach, 1884
1940'lı yılların öncesi	Hekimler invaziv Stafilocok infeksiyonlarında görülen önemli mortalite karşısında çaresiz kaldılar	Fluit ve Schmitz 2003, Richardson vd., 1994
1950'li yıllar	Çoklu direnç gösteren <i>S. aureus</i> ortaya çıktı, direnç faj 80a yolu ile yayılıyordu	Barber, 1961
1959	Penisilin dirençli <i>S. aureus</i> 'un tedavisinde metisilinin geliştirilmesi	Richardson vd., 1994
1961	Metisilin direnci <i>S. aureus</i> 'un laboratuvar suşlarından bildirildi	Barber, 1961
1963	İlk doğal olarak görülen metisilin dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA) rapor edildi	Jevons vd., 1963
1960-2000	Stafilocoklarda makrolid, tetrasiklin, kloramfenikol, aminoglikozid ve fluorokinolon dirençleri bildirildi	Lyon vd., 1987, Shanson, 1961
1980'li yıllar	Metisilin direncinin genetik temeli açıklandı, PBP2a karakterizasyonu yapıldı	Hartman ve Tomasz, 1984, Matsushashi vd., 1986

Stafilocoklar; Gram pozitif, 0,5-1,5 µm çapında kok şeklinde, spor oluşturmayan, hareketsiz, patojen türleri kapsüllü, bazı suşları hariç (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subspecies *anaberoibius*) fakültatif anaerofilik bakterilerdir. Mikroskop altında tekli, ikili, dörtlü koklar halinde görülebilir, bazen de birkaç kokun yan yana dizilmesi ile kısa zincirler ya da üzüm salkımı benzeri şekiller ortaya çıkarabilirler (Holt vd., 1994; Tükel vd., 2000; Quinn vd., 2004; Akan, 2006; Ilgaz vd., 2011).

Stafilocoklar sıvı besiyerinde üretildiklerinde homojen bulanıklık ve/veya çöküntü oluştururken, katı besiyerlerinde aerob ve fakültatif anaerob ortamlarda kolayca üreyebilirler. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün kenarlı, hafif konveks, opak, 1-4 mm çapında koloniler yapmaktadırlar (Holt vd., 1994). Gram pozitif olan Stafilocoklar, eskimiş kültürlerden yapılan Gram boyamada Gram

negatif reaksiyon verebilirler (Yüce, 1992). Stafilokoklar çevre şartlarına ve dezenfektanlara en çok dayanan, kültürlerde 4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay dayanma süresine sahip mikroorganizmalar olup, 60 °C'de 30 dakikalık ısı işlemlere de dayanıklılık gösterirler. Etkenler yüksek tuz yoğunluklarına da dayanıklılık göstermekte olup %7,5-%10 NaCl içeriğine sahip ortamlarda üreyebilmektedir. Antibiyotiklere karşı çok kolay direnç oluştururlar. Penisilinaz etkisiyle penisilinin etkisini ortadan kaldırırlar (Yüce, 1992; Holt vd., 1994; Kloos ve Bannerman, 1999; Quinn vd., 2004; Akan,2006; Winn vd., 2006).

1.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adını genel besiyerlerinde altın sarısı renginde koloni oluşturmasından almıştır. 16S rRNA sekans analizinde Staphylococcaceae familyasında yer alan *S. aureus*'un genomu yaklaşık olarak 2,8 Mbp uzunluğunda olup; profajlar, transpozonlar ve plazmidler gibi ekstra kromozomal genetik elementler içerir (Franklin, 1998; Fong ve Kolia, 2003).

Çizelge 1.2 *S. aureus*'un sınıflandırılması (Todar,1994)

Domain	Bacteriae
Alem	Eubacteria
Bölüm	Firmicutes
Sınıf	Bacilli
Takım	Bacillales
Aile	Staphylococcaceae
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür	<i>S. aureus</i>

Çizelge 1.3. Hayvanlarda *S. aureus* etiyolojili bazı enfeksiyonlar (Quinn vd.,1999; Quinn vd., 2004)

Konakçı	Enfeksiyon
Sığır	Subklinik, kronik, akut, perakut veya gangrenöz mastitis Meme impetigosu Meme başı püstülleri
Koyun	Akut, perakut veya gangrenöz mastitis Kene piyemisi Periorbital egzama Stafilokokal dermatitis
Keçi	Subakut veya perakut mastitis Stafilokokkal dermatit
Domuz	Akut, subakut ve kronik mastitis Botriyomikoz Nekrotik Stafilokokal endometritis Meme impetigosu
At	Akut mastitis Botriyomikoz (kastrasyonu takiben)
Tavşan	Yeni doğan eksudatif dermatitisi Apse Konjuktivitis Piyemi
Kümes hayvanları	Bumble-foot Artritis ve septisemi Omfalitis (nadir)
Kedi-köpek	Supuratif lezyonlar

1.1.1.1. *Staphylococcus aureus*'un Kültür, Üreme Özellikleri ve İdentifikasyonu

Staphylococcus 'lar aerobik veya fakültatif anaerobik şartlar altında 37 °C'de kolayca üreme özelliğine sahiptir. Seçici olmayan besiyerinde düz, parlak, dairesel, konveks koloniler oluştururlar. *S. aureus* genellikle beyazdan sarıya kadar değişik renklerde koloniler oluşturmaktadır. Etken, %10'luk NaCl konsantrasyonlarında çok iyi gelişirken, %15'lik NaCl konsantrasyonlarında gelişimleri zayıftır. Optimum gelişmeleri 30-40 °C'de ve 7-7,5 pH'da kolaydır. Ayırt edici besiyerinden mannitol salt agarda yüksek yoğunlukta tuz varlığında üreyebilen Stafilokoklardan *S. aureus*, diğer *Staphylococcus* 'lardan mannitolu fermente ederek koloniler etrafında sarı hare oluşturmasıyla ayrılır. Mannitol salt agarda bakterilerin üreyebilmesinin belirlenmesi

için 48-72 saat inkubasyon gerekli olabilmektedir. Etkenler aneorobik ortamda birçok karbonhidratı metabolize ederek asit oluşturmalarına rağmen; arabinoz, sellobiyoz, dekstrin, inositol, rafinoz ve ksilozdan asit oluşturmazlar. *S. aureus*'u diğer türlerden ayıran özellikleri arasında anaerobik ortamda glukozu ve mannitolü fermente etmeleri ve α -toksin oluşturmaları yer alır (Holt vd., 1994; Quinn vd., 1999; Quinn vd., 2004).

Stafilokokların identifikasyonunda en önemli adımlardan bir tanesi koagülaz testidir. Laboratuvar ortamında koagülaz testi; lamda koagülaz testi ve tüpte koagülaz testi olmak üzere iki yöntemle tespit edilir. Koagülaz testi lam yöntemi ile bağlı, tüp yöntemi ile serbest koagülazın tayini için kullanılır. Lamda koagülaz reaksiyonu negatif olan Stafilokoklar için mutlaka tüp koagülaz testinin de uygulanması önerilir. Koagülaz pozitif olan Stafilokokların (KPS) identifikasyonunda Voges-Proskauer ve L-pirolidonil aminopeptidaz (PYR) testleri de uygulanmaktadır. *S. aureus*'un nükleik asitleri hidrolize eden deoksiribonükleaz (DNaz) ve termostabil endonükleaz enzimleri üretebilmesinden faydalanılarak hazırlanan testlerden de yararlanılır (Holt vd., 1994; Quinn vd.,1999; Quinn vd., 2004).

1.1.1.2. Virulans Faktörleri

Stafilokoklar konakçı vücuduna giriş yaptığı zaman immun sistem hücreleri olan nötrofiller tarafından öldürülürler. Bu nedenle Stafilokokların virulans faktörleri daha fazla hücre içi ölümlerden veya fagositozdan kurtulma yönünde gelişim gösterirler. Virulans faktörlerinin çoğu klinik semptomların (örn. toksik şok sendromu) ortaya çıkmasından sorumludur. Ancak bazı ciddi *S. aureus* enfeksiyonlarının çoğunluğu tek bir virulans faktörünün etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon süreci esnasında değişik hastalıkların karışmasıyla virulans faktörleri Stafilokokal hastalıkların patogeneze katkıda bulunurlar. *S. aureus*'un virulens faktörleri yapısal bileşenler, enzimler ve toksinler olmak üzere üç başlık altında toplanırlar (Peacock, 2006; Ilgaz vd., 2011).

1.1.1.2.1. Adezinler

Ekstraselüler patojenik bir bakteri olan *S. aureus*, infeksiyon sürecinin ilk aşaması olarak kolonizasyonu sağlayan komponentler yardımıyla konak hücrelerinin ekstraselüler yüzeylerine yapışır. Bu yapışma "Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM)" olarak tanımlanan yüzey proteinleri ile ilişkilidir. Bu adeziv moleküller *S. aureus*'un hücre duvarı yüzeyinde bulunur. Adezinler çoğunlukla hücre duvar peptidoglikanına kovalent olarak bağlanırlar (Patti vd., 1994; Peacock, 2006). Bunlar sırasıyla;

Fibrinojen bağlayan proteinler (ClfA, ClfB ve Fbp)

Fibronektin bağlayan proteinler (FnbA ve FnbB)

Kemik sialoprotein bağlayan proteinler (Bbp)

Kollajen bağlayan proteinler (Cna)

Elastin bağlayan proteinler (EbpS)

Yüzeysel özel adezin proteinleri

Protein A'dır (Patti vd., 1994).

Adezinler; elastin bağlayan proteinler, kollajen bağlayan proteinler, fibronektin bağlayan proteinler, Protein A, clumping faktör gibi kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirine benzeyen yüzey bileşenleridir. Bu proteinlerin prototipi olan **protein A**'nın en önemli özelliği bazı immunoglobülinlerin (IgG1, IgG2, IgG3) kristalize fragment (Fc) reseptörleri ile birleşebilmesidir. Güçlü immnojenik karaktere sahip olan protein A komplementi aktive etme özelliğine sahip olmasıyla antifagositik, kemotaktik ve mitojenik karaktere sahiptir. Ayrıca hücre dışına salınan protein A aynı reseptöre bağlanarak komplemente bağlı vücut savunmasında bakteriyi korur. Bazı enfeksiyon hastalıklarının tanısında *in vitro* deneylerde (antijen aramak amacıyla kullanılan aglütinasyon temeline dayanan) kullanılabilir (Peacock, 2006).

S.aureus yakın ilişkili olarak iki gen tarafından kodlanan ve FnbA ve FnbB olarak bilinen iki **fibronektin bağlayan protein (Fnb)** salgılamaktadır. Bu proteinler endokarditis ve osteomyelitis enfeksiyonlarında önemli rol oynarlar (Jonsson vd., 1991; Johansson vd., 2001).

Kemik sialoprotein bağlayan proteinler (Bbp): Sadece kemik ve dentin tabakası üzerinde bulunan ekstraselüller matriks proteinleridir (Oldberg vd., 1988). *S.aureus*'un bu proteine bağlanması Mr 97000'ün kemik sialoprotein-bağlayan proteini ile ilişkilidir (Yacoub vd., 1994).

Kollajen bağlayan protein (Cna): Kollajen pek çok dokuda ekstraselüler matriksin en önemli bileşeni olarak kabul edilir. *S. aureus*, kırıkdağa adezyonunu için gerekli olan kollajen bağlayan bir protein salgılar (Peacock, 2006).

Elastin bağlayan proteinler (EbpS): *S.aureus*'un doku ve organlarına elastikiyet kazandırmak olan en önemli yapısal proteindir. Elastin salgılanması akciğer, deri, kan damarlarında en yüksek seviyededir. Ancak elastin memeli dokularında düşük seviyelerde salgılanır (Peacock, 2006).

1.1.1.2.2. Hücre Duvarı ve Kapsül

Stafilokokların hücre duvarının ana yapısını diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi peptidoglikan ve teikoik/lipoteikoik asit oluşturur (İlgaz vd., 2011). Bakterinin kuru ağırlığının yaklaşık %50'si N-asetilglukozamin (NAGA) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) polimerlerinden oluşan disakkarit yapıdaki **peptidoglikan** tabakasından oluşur. Peptidoglikan tabakası mikroorganizmanın osmotik stabilitesini sağlayarak bakteriye şeklini verir. Ayrıca peptidoglikan tabakası makrofajlardan sitokin salınımını uyarmasıyla komplement aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olur. Monositlerden interlökin-1 (IL-1) salınımını uyarmasıyla polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmasına ve apse oluşumuna

yol açar (Peacock, 2006). Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan ve ribitol veya gliserol fosfat polimerlerinin birbirlerine fosfodiester bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan **teikoik asit**, bakterinin konakçı hücrelerine adezyonunu sağlar. Tek başına iken zayıf bir immunojen olan teikoik asit, peptikoglikanla birleştiğinde spesifik antikor yanıtını oluşturabilen güçlü bir virulans faktörü etkisine sahiptir (Peacock, 2006; Ilgaz vd., 2011).

Ekzopolisakkarit yapıya sahip olan **kapsül**, "bakteriyel kapsüler polisakkarit" olarak adlandırılırlar. Bakterinin konak hücreye adezyonunu sağlayarak enfeksiyon patogenezinde önemli bir virulans faktörü olan kapsül, bakteriyi fagositoza karşı da korur. Günümüze kadar tanımlanan 11 kapsüler serotipin içinde özellikle tip 8 ve tip 5 insan enfeksiyonlarının çoğundan sorumlu tutulmaktadır (Franklin, 1998; Fong ve Kolia, 2003).

1.1.1.2.3. Biofilm Oluşumu İle İlgili Yüzey Bileşenleri

S. aureus'un konak hücrelerine kolonizasyonundaki ilk adım yapışmadır. Bakteri bunu MSCRAMM molekülleri yardımıyla yapar, ancak hedefine ulaşmak için ikinci bir yol biyofilm oluşumudur. Eğer bu yapı ince, hücre duvarına sıkıca yapışık değil ve kolaylıkla ayrılabilir bir yapıda ise bu tabaka "slaym tabakası" olarak adlandırılır. Slaym tabakasının %97 su olmak üzere %1-2 protein, %1-2 polisakkarit, %1-2 DNA ve iyonlar bulunmaktadır. Bu bileşenlerden herhangi birisinin eksik olması durumunda biyofilm oluşmamaktadır (Yüksekdağ ve Baltacı, 2013).

Slaym faktörünün kemotaktik etkisinin olduğu fakat slaym tarafından uyarılan polimorf çekirdekli lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının az olduğu görülmüştür. Bu durum mikroorganizmanın hücre içinde yaşam süresinin uzamasına neden olmaktadır ve slaym oluşturan bakterilerle gelişen hastalıklarda antibiyotik tedavisi başarısızlığına ve kronik enfeksiyonlara daha sık rastlanılmaktadır (Christensen vd., 1994).

Antimikrobiyaletkenlere direnç anoksik çevreye ve besin yokluğuna uyum, hücre bölünmesinin radikal bir şekilde azalması (downregüle) ve düşük metabolik aktivite ile karakterize fenotip yoluyla olmaktadır. Stresli biyofilm matrisinde antibiyotiklerin yüksek seviyelere toleranslı yavaş büyüyen hücreler oluşmaktadır. (Lewis, 2010).

1.1.1.2.4. Ekstraselüler Protein Toksinleri

S. aureus konak hücre morfolojisini veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilir ve bu toksinler sayesinde çok yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilir (Peacock, 2006).

Hemolizinler; çeşitli hayvanların ve insanların eritrositlerinde lizis yapıp yapmamalarına, ortamın ısı derecesi ve zamana, toksisite derecelerine bağlı olarak alfa, beta, gama ve delta hemolizinler olarak sınıflandırılırlar. Hemolizinler çoğu *S. aureus* suşunda kromozom üzerinde kodlanmış olarak bulunurlar (Quinn, 2004; Peacock, 2006).

Alfa hemolizin (Alfa toksini); Eritrosit ve bazı lökosit tipleri üzerine hemolitik etkiye sahip olmasına karşın nötrofillere karşı etkisizdir. Özellikle tavşan eritrositlerine karşı hemolitik aktivitesi yüksek olan α -toksin aynı zamanda nörotoksik ve dermonekrotik etkiye de sahiptir. Tavşan eritrositlerinin alfa toksine diğer memeli eritrositlerine oranla en az 100 kat, insan eritrositlerine göre ise 1000 kat duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Dinges vd., 2000; Otto, 2014). Bu sitotoksin kırmızı kan hücrelerini ve lökositleri protein içerikli reseptör yoluyla ADAM10, disintegrin ve metalloproteinaza bağlanarak parçalar (Valeva vd., 1997; Wilke ve Bubeck Wardenburg, 2010).

Beta hemolizin (Beta toksini, sfingomyelinaz C); Hücre membranında bulunan sfingomyelin ile eritrosit, lökosit ve fibroblast hücrelerine etki ederler ve en iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerine litik etki

gösterirler. Antijeniktir, antitoksini ile nötralize olur ve formol ile toksoide hale getirilebilir. Alfa ve beta toksini invaziv Stafilokok enfeksiyonları için tipik doku hasarı ve apse oluşumundan sorumlu tutulurlar. Beta toksin aynı zamanda *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen ve *S. aureus*'un hemoliz etkisini arttıran etkiye sahip olan CAMP faktörle etkileşen sinerjik hemolize neden olan yapıdır (Peacock, 2005; Alen vd., 2006; Moreillon vd., 2005).

Gama hemolizin (Gama toksin); hemolizin tavşan eritrositi için hemolitik ve membran hasarı lökositlerde (nötrofil, monosit, granulosit ve makrofaj) de gözlenmiştir (Vandenesch vd., 2012). Bu grup hemolizinler S (slow, HIgA ya da HIgC) VE f (fast, HIgB) olarak tanımlanan polipeptidlerden oluşmaktadır. S bileşenlerinin toksinlerin hücre tipine hassas olarak etki göstermektedir. F bileşeni konak hücrelerde fosfatidilkolini hedef aldığı, S bileşenini ise konak hücre membranına bağlandığını ve hücre parçalanmasına neden olduğu belirtilmiştir (Meyer vd., 2009).

Delta hemolizin (Delta toksin); 3 kDa molekül ağırlığında olan delta toksin hücre membranında porlar oluşturabilen polipeptid olup birçok *S. aureus* suşu tarafından sentezlenebilir. Geniş sitolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen diğer sitolitik toksinler kadar etkin değildir. Gama toksin eritrositler ve diğer memeli hücreleri ile beraber membrana bağlı organeller, sferplast ve protoplast subselüler yapıları da lize etmektedir (Dinges vd., 2000).

Eksfoliyatif toksin; epidermolitik bir toksin olup protein yapılıdır. Stafilokokal enfeksiyonların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarının oluşmasından sorumludur. Toksin, immunolojik etkileri farklı 24 kDa moleküler ağırlığında preteolitik özellikleri sayesinde epidermisin mukopolisakkarit matriksini parçalayarak aynı biyolojik aktiviteleri gösteren Epidermolitik Toksin A (ET-A) ve Epidermolitik Toksin B (ET-B) olmak üzere ikiye ayrılır. ET-A kromozomal kökenli olup 100 °C ısıya 20 dakikaya kadar dayanır. ET-A epidermisteki stratum granulosum tabakasını oluşturan hücrelerin bağlarının kopmasına ve stratum

granulosumun ayrılmasına neden olur. Bu nedenle soyulmuş (haşlanmış) deri lezyonlarına (staphylococcal skin syndrome, SSS) neden olur (Peacock, 2006).

Enterotoksinler; ilk defa 1914'de Barber'in Stafilokokal mastitisli ineğin sütünü içmesi sonrasında ortaya çıkan ve mide bulantısıyla seyreden akut gastrointestinal enfeksiyon şekillenmesiyle fark edilmiş, ancak 1930'lu yıllarda Duck tarafından kanıtlanana kadar tam olarak anlaşılmamıştır. Enterotoksinler aslında ekzotoksin olup ancak sindirim sistemini etkilediği için enterotoksin olarak adlandırılmaktadır. Enterotoksinler insan beynindeki kusma merkezini uyarırlar ve kusmaya neden olduklarından nörotoksin etki de gösterirler (Marth ve Halpindohnalek, 1989). Isıya dirençli, 100 °C'ye 30 dakika dayanabilen, molekül ağırlığı 26900-29600 kDa arasında değişkenlik gösteren polipeptid (daha çoğunlukla lizin, tirozin, aspartik asit ve glutamik asit) yapısında maddelerdir. Sıcaklığa olduğu kadar toksinlerin pepsin ve tripsin gibi preolitik enzimlere karşı da dayanıklı olması, enterotoksinlerin sindirim dokularından etkisini yitirmeden geçmesine olanak sağlamaktadır (Konaç, 2006).

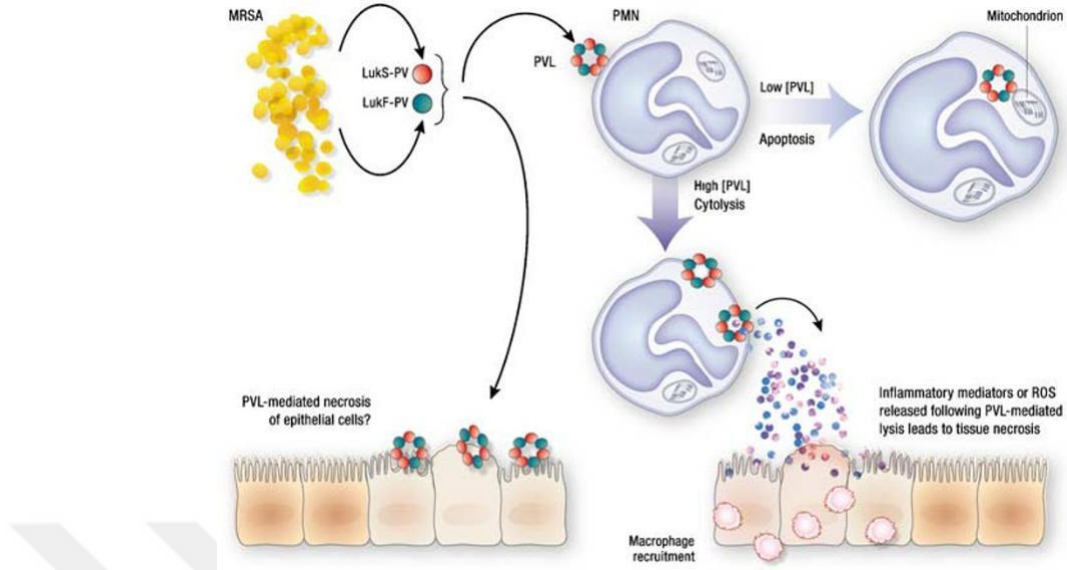
Enterotoksinler; makrofaj ve yardımcı T lenfositlerden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarak sindirim kanalında süper antijen olarak davranırlar. *S. aureus* suşlarının %35-50'sinin bu toksinleri oluşturduğu bilinmekte olup, besin zehirlenmelerinde en sık karşılaşılan toksinler A ve D tip enterotoksinlerdir (Moreillon vd., 2005; Alen vd., 2006).

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1); sistemik olarak salınan, 22 kDa moleküler ağırlığa sahip, protein yapısındadır. Süper antijen gibi davranan TSST-1, T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. Son yıllarda KNS türlerinin neden olduğu toksik şok sendromu da bildirilmiştir (Dinges vd., 2000; Moreillon vd., 2005; Alen vd., 2006).

Lökotoksinler (Lökosidinler); membran hasarı oluşturan, lökosit tahribatına neden olan toksinlerdir. Beşeri hekimlikte lökosit toksin üreten

izolatların nekrotik deri lezyonları, frunkulozis, osteomyelitis, kanama ve nekrotizan pnömoni vakalarından izole edildiği bildirilmiştir (Lina vd., 1999; Koneman vd., 2006; Peacock, 2006)

Lökosidinler polimorf nükleer nötrofiller ve makrofajlar üzerinde sinerjik olarak etki yapan, molekül ağırlığı 32 kDa olan fast (F) ve 35 kDa olan slow (S) olmak üzere iki protein komponentinden oluşurlar. Lökosidin; hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği arttırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. Komponentler ayrı ayrı bulunurlar, ancak litik etkilerini gösterebilmeleri için bir araya gelmeleri gerekir. Sinerjistik etkiler ile bu komponentler lökositlerin membranlarında iyon geçirgenliğini arttıran gözenekler açılmasına sebep olurlar. *S. aureus*'un en önemli lökosidini Panton-Valentine Lökosidin (PVL) insanlarda nekrotizan primer kutanöz infeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, nekrotizan pnömoni ve tekrarlayan osteomyelitislerle ilişkilendirilmesi sebebiyle özellikle MRSA infeksiyonların patogeneğinde önemli virulans faktörüdür (Lina vd., 1999; Peacock, 2006; Monecke vd., 2007; Lo ve Wang, 2011).



Şekil 1.1: PVL'nin doku nekrozuna nasıl aracılık ettiğini gösteren model. PVL, LukS-PV ve LukF-PV'nin iki bileşeni, PMN membranları üzerinde gözenek oluşturan bir heptamerde birleşmeden önce *S. aureus*'tan salgılanır. Yüksek PVL konsantrasyonları PMN lizisine neden olurken, düşük konsantrasyonlar doğrudan mitokondriyal membranlara bağlanarak yeni bir PMN apoptosis yolağına aracılık eder. Doku nekrozu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) lizislenmiş PMN'lerden salınmasından kaynaklanabilir. Alternatif olarak, parçalanmış PMN'lerden granül içeriğinin salınması, enflamatuvar bir yanıt oluşturarak sonuçta doku nekrozuna yol açabilir. PVL'nin epitel hücreleri üzerinde doğrudan bir nekrotik etkiye sahip olması muhtemel değildir (Boyle-Vavra ve Daum, 2007)

1.1.1.2.5. Enzimler

Stafilokoklar konakçı sisteminde kendilerine avantaj sağlayan birçok enzime sahiptir. Bu enzimler, Stafilokokların yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogenezinde rol oynarlar (Peacock, 2006).

Katalaz; tüm Stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subspecies. *anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi (H_2O_2), toksik olmayan oksijen ve suya ayıran enzimdir. Ayrıca bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanırlar (Koneman vd., 2006).

Koagülaz; Stafilokoklar tarafından üretilen plazma pıhtılaşma proteini olup, *S. aureus* 'un bütün suşları koagülaz pozitifdir. Koagülaz proteini lamda ve tüpte koagülaz testleri ile belirlenir. Serbest koagülaz ve bağlı koagülaz (clumping faktör) olmak üzere iki türü vardır. Yapılan çalışmalarda KPS türlerinde kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruduğu ve patojeniteye katkı sağladığı belirtilmiştir (Cengiz, 1999; Koneman vd., 2006).

Lipaz; KNS'ların yaklaşık %30'undan fazlası tarafından üretilir ve yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde Stafilokokların yaşamasını sağlar. Yüzey dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonların gelişimine neden olmaktadır (Cengiz, 1999; Koneman vd., 2006).

Hyaluronidaz; *S.aureus* suşlarının yaklaşık olarak %90'ından tarafından üretilen enzim özellikle bağ dokusunda bulunan hücreleri birarada tutan asidik formda mukopolisakkaritlerden hyaluronik asidi hidrolize ederek etkenin doku içlerinde yayılımını sağlamaktadır. Bu enzim bakterilerin dokuda yayılımını sağladıklarından dolayı 'yayılma faktörü' olarakta adlandırılmaktadır (Sandel ve Mc Killip, 2004, Winn vd., 2006, Hart vd., 2009).

Fibrinolizin (Stafilokinaz); plazmada bulunan plazminojeni aktive ederler ve plazmin oluştururlar. Fibrinolitik etkisi ile fibrini parçalar ve organizmanın yayılmasına neden olurlar (Koneman vd., 2006).

Fosfatidil inozitol-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) sayesinde *S. aureus* ökaryotik hücre membralarındaki fosfolipitleri hidrolize ederek hücresel sinyal yapısını bozmakla beraber, kutanöz ve subkutanöz dokulara yayılımı sağlanmış olur. PI-PLC tarafından yıkılan dokular komplement aktivasyonu sırasında biyoaktif tamamlayıcı birleşenler ve ürünler tarafından daha duyarlı hale gelmektedir (Kızınlık, 2019). Fosfatidil inozitol; erişkin tip solunum güçlüğü sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlardan saptanmış olup, bu suşlar penisilinlere dirençlidir (Alen vd., 2006).

Deoksibonükleaz (DNaz); ısıya dirençli olan, endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip ve nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotitlere parçalayan fosfodiesterazlardır (Koneman vd., 2006).

Beta-laktamaz; Stafilocokların çoğu tarafından salgılanan, penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştiren enzimdir (Peacock, 2005; Alen vd., 2006).

Staphylococcus türlerinin çeşitli virulans faktörleri Çizelge 1.5'de, *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler ise Çizelge 1.4'da özetlenmiştir.

Çizelge1.4. Stafilocokların virulans faktörleri (Lowy,1999; Kloos ve Bannerman, 1999; Bohach ve Foster, 2000; Berkiten, 2005)

Hücresel bileşenler	Hücre dışı ürünler
-----	TOKSİNLER
Kapsül	Alfa toksin
Protein A	Beta toksin
Elastin bağlayıcı protein	Gama toksin
Kollajen bağlayıcı protein	Delta toksin
Fibronektin bağlayıcı protein	Lökosidin
Kümeleştirici faktör	Enterotoksinler
Peptidoglikan	Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)
Teikoik asit	Eksfoliatif toksin
Lipotikoik asit	
Slime tabakası	
	ENZİMLER
	Koagülaz
	Stafilokinaz
	Nükleaz-DNaz
	Hiyalüronidaz
	Lipaz
	B-laktamaz
	Proteaz
	Fosfataz
	Lizozim
	Laktat dehidrogenaz
	Katalaz
	Asit fosfataz

Çizelge 1.5. *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler (Timbury vd., 2002)

Toksin	Etki
Hemolizinler (α , β , γ)	Sitolitik: Çeşitli hayvan türlerinde eritrositlerin lizisi
Koagülaz	Plazmayı pıhtılaştırır. Laboratuvarlarda KPS ve KNS türlerinin ayırımında kullanılır.
Fibrinolizin	Fibrinin sindirimi
Lökositin	Lökositlerin tahribi
Hyaluronidaz	Hyaluronik asidin parçalanması
Dnaz	DNA hidrolizi
Protein A	Lipolitik
Kapsül	Antifagositik
Epidermolitik toksin	Epidermal yayılma ve ekfoliatin
Enterotoksinler	Kusma, ishale sebep olan gıda zehirlenmeleri
Toksik Şok Sendrom Toksini	Şok, deri döküntüsü

1.1.2. Metisilin Direnci

Son yıllarda hastane enfeksiyonlarının spektrumunda yer alan hemen hemen tüm mikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirdiği görülen *Staphylococcus aureus* suşlarında penisilinin yaygın kullanımından kısa süre sonra penisilin direnci, yaklaşık bir yıl sonra da metisilin direnci ortaya çıkmıştır. Stafilokoklarda metisilin direncinden Stafilokokal *cassette chromosome mec* (*SCCmec*) adı verilen 40-60 kilobayt (kb) bir DNA bölgesinde yer alan *mecA* geni sorumludur (Sevgican vd., 2009; Hasbek, vd., 2002).

S. aureus'ta epidemiyolojik olarak metisiline karşı en önemli antibiyotik direnç mekanizması; tüm β -laktamlara düşük affiniteli olarak ekstra penisilin bağlayıcı bir proteini (PBP2a) kodlayan kazanılmış bir gen olan *mecA* ile ilişkilidir. *mecA*'nın *S. aureus* kromozomuna sokulması yüksek mortalite oranlarından sorumlu olan MRSA pandemilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Rolo vd., 2017). Metisiline dirençli genlerin yayılması 1940'larda penisilin direncinin ortaya çıkmasıyla görülmüştür. 1960'larda farklı baskın faj tipleriyle (örneğin 83 kompleks) klonal yayılma dalgaları bildirilmiştir ve vakaların büyük bir kısmından sorumlu tutulmuştur (Lowy, 2003). *mecA* geni 40-60 kb büyüklüğünde genetik bir element olan *SCCmec* üzerinde yer alır. Her ne kadar araştırmalar her geçen gün artsa da

SSC*mec*'in horizontal transfer ile oluştuğu öne sürülmüştür (Boyle-Vavra ve Daum, 2007; Yılmaz, 2019). SCC*mec*; metisilin direncinde aktif rol oynayan ve PBP2'nin değişikliğe uğramış hali olan PBP2a'yı kodlayan *mecA* ve *mecC* geni ile *mecA* transkripsiyonunu düzenleyen *mecI* ve *mecRI* genlerinden oluşmaktadır (Boyle-Vavra ve Daum, 2007). MRSA izolatlarının çok büyük bir kısmı kromozomları üzerinde *mecA* genini taşırlar. PBP2a dünyanın çoğu bölgesinde izole edilmiş ve metisiline dirençli olan KPS ya da KNS türlerinde gösterilmiştir. Metisiline duyarlı olanlarda ise *mecA* geni mevcut değildir (Wang vd., 2015).

S. aureus'larda *mecA* geninin varlığı ile ortaya çıkan metisilin direnci fenotipik olarak homojen ve heterojen direnç olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelmektedir. Homojen direncin görüldüğü *S. aureus*'lar *mecA* genini taşırlar ve hepsinde bu gen eksprese olmuştur. Yüksek düzeyde dirence sebep olurlar ve direncin tespiti ortamın pH'sı ısı, tuz konsantrasyonu, inkubasyon süresi gibi çevresel faktörlerle ilişkili değildir. Heterojen dirençte ise; koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mecA* geni taşımasına rağmen direnç ancak 10^6 ya da 10^8 bakteriden birinde tespit edilmektedir. En sık karşılaşılan direnç türüdür. Bunların *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği sanılan *femA* (metisilin direncinin ekspresyonu için gerekli faktörler, factors essential for the expression of methicillin resistance), *femX* veya *mecR*, *mecI* gibi kontrol genlerine bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bu direnç türü duyarlılık testlerinde %4'lük NaCl içeren ortamda, düşük ısıda ve inkubasyon süresinin 48 saat olduğu şartlarda daha iyi tespit edilmiştir (Ünal, 1996).

Çizelge 1.6. Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları (Ünal, 1996)

İntrinsik (kromozomal) direnç	-Yeni bir PBP=PBP2a sentezi nedeni ile oluşan direnç A)heterojen direnç B)homojen direnç
Kazanılmış (plazmid) direnç	-Mevcut PBP2'lerin beta laktam antibiyotiklere afinitelerinin azalması Stafilokokal beta laktamazların fazla salgılanmaları

Bu alışmada Afyonkarahisar ilinde, aile işletmelerinde üretilen ve halka açık pazarlarda satışa sunulan kaymaklardan *S. aureus* izolasyonu ile izole edile suşlarda *mecA* ve *pvl* genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.



2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kaymak Örneklerinin Toplanması

Kasım 2019 ve Aralık 2020 tarihleri arasında Afyonkarahisar ili merkez ilçe ve diğer ilçelerde bulunan pazar yerlerinden ve üreticilerin evlerinden toplam 110 adet her biri 200 g ev tipi üretim yapılan kaymak örneği alındı. Alınan kaymaklar aynı gün içerisinde, aseptik koşullarda ve soğuk zincirde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Kaymakların 85'i inek kaymağı, 14'ü manda kaymağı, 11'i ise inek ve manda sütü karışık kaymak olarak sınıflandırıldı. Örneklenen kaymakların örnekleme yapılan yerlere ve orijinine göre dağılımı Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Kaymak örneklerinin toplandığı yerler, örneklerin orijini ve üretim tipi

Örnek No	Örneklerin Toplandığı Yer	Örneklerin Orijini
1	Sülümenli	İnek
2	Sülümenli	İnek
3	Sülümenli	İnek
4	Sülümenli	İnek
5	Beyyazı	İnek
6	Beyyazı	İnek
7	Küçükçobanlı	Karışık
8	Akören	İnek
9	Küçükçobanlar	Karışık
10	Küçükçobanlar	İnek
11	Belce	İnek
12	Gazlıgöl	İnek
13	Gazlıgöl	İnek
14	Üçlerkayası	Karışık
15	Akören	İnek
16	Mahmutköy	Manda
17	Şuhut Çobanlar Köyü	Karışık
18	Küçükçobanlar	Manda
19	Küçükçobanlar	Manda

Çizelge 2.1: Devam

20	Büyükçobanlar	İnek
21	Büyükçobanlar	İnek
22	Küçükçobanlar	İnek
23	Küçükçobanlar	İnek
24	Akören	İnek
25	Akören	İnek
26	Beyyazı	İnek
27	Beyyazı	İnek
28	Beyyazı	İnek
29	Beyyazı	İnek
30	Beyyazı	İnek
31	Çobanlar	Manda
32	Çobanlar	Manda
33	Çobanlar	Manda
34	Çobanlar	Manda
35	Çobanlar	Manda
36	Belce	Karışık
37	Belce	Karışık
38	Gazlıgöl	İnek
39	Gazlıgöl	İnek
40	Gazlıgöl	İnek
41	Gazlıgöl	İnek
42	Gazlıgöl	İnek
43	Gazlıgöl	İnek
44	Gazlıgöl	İnek
45	Ablak	Karışık
46	İhsaniye	Karışık
47	Gazlıgöl	Karışık
48	Beyyazı	İnek
49	Beyyazı	İnek
50	Beyyazı	İnek
51	Beyyazı	İnek
52	Beyyazı	İnek
53	Beyyazı	İnek
54	Beyyazı	İnek
55	Beyyazı	İnek
56	Beyyazı	İnek
57	Beyyazı	İnek
58	Akören	İnek
59	Akören	İnek
60	Akören	İnek
61	Akören	İnek
62	Akören	İnek
63	Akören	İnek
64	Akören	İnek
65	Cumalı	İnek
66	Cumalı	İnek
67	Cumalı	İnek

Çizelge 2.1 Devamı

68	Cumalı	İnek
69	Cumalı	İnek
70	Cumalı	İnek
71	İhsaniye	İnek
72	Cumalı	İnek
73	Sülümenli	İnek
74	Sülümenli	İnek
75	Sülümenli	İnek
76	Sülümenli	İnek
77	Beyyazı	İnek
78	Beyyazı	İnek
79	Beyyazı	İnek
80	Beyyazı	İnek
81	Sülümenli	İnek
82	Sülümenli	İnek
83	Sülümenli	İnek
84	Beyyazı	İnek
85	Beyyazı	İnek
86	Sülümenli	İnek
87	Sülümenli	İnek
88	Cumalı	İnek
89	Cumalı	İnek
90	Sülümenli	İnek
91	Beyyazı	İnek
92	Akören	İnek
93	Şuhut	İnek
94	Şuhut	İnek
95	Akören	İnek
96	Beyyazı	İnek
97	Beyyazı	İnek
98	Küçükçobanlar	İnek
99	Gazlıgöl	İnek
100	Akören	İnek
101	Gazlıgöl	Manda
102	Gazlıgöl	Manda
103	Belce	Karışık
104	İhsaniye	Manda
105	Gazlıgöl	İnek
106	Gazlıgöl	İnek
107	Akören	Manda
108	Akören	Karışık
109	Gazlıgöl	Manda
110	Gazlıgöl	Manda

2.1.2. Besiyerleri, Solüsyonlar, Çözeltiler, İdentifikasyon Kitleri

Baird Parker agar (BPA) (Merck, Almanya)
Egg-yolk tellurite emulsion (Merck, Almanya)
Brain heart infusion broth (BHIB) (Oxoid, İngiltere)
Fizyolojik tuzlu su (%0,9'luk FTS)
Gram boyama solüsyonları
Hidrojen peroksit çözeltisi (%3'lük ve %30'luk H₂O₂)
Tryptone soy agar (TSA) (Oxoid, İngiltere)
Trypticase soy broth (TSB) (Oxoid, İngiltere)
Oksidasyon/fermantasyon (O/F) basal medium (Merck, Almanya)
Oksidaz strips (Oxoid, İngiltere)
Parafin (Tekkim, Bursa, Türkiye)
Gliserin (Tekkim, Bursa, Türkiye)
%1'lik glukoz ve mannitol solüsyonları
EDTA'lı tavşan plazması (BD BBL™, ABD)

2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Buffer, Solüsyon, Ekipman ve Cihazlar

Vorteks (Ika, Almanya)
Hassas Terazi (Ohaus-Pioneer, İsviçre)
Tris-Borate-EDTA Buffer 10X (10XTBE Buffer) (ThermoFisher Scientific, Almanya)
Ethidium bromid solüsyonu (AppliChem, Almanya)
Agaroz (Basica Le Agarose, Fransa)
Primerler (ThermoFisher Scientific, Almanya)
dNTP mix (Fermantas, Litvanya)
MgCl₂ (Fermantas, Litvanya)

Taq DNA Polymerase (Fermantas, Litvanya)
5XLoading dye (Fermantas, Litvanya)
Soğutmalı santrifüj (Sigma, Almanya)
Thermal cyclers (Techne-TC-Plus, İngiltere)
Elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)
Jel elektroforez cihazı (Thermo Scientific, ABD)
UV-transilluminatör (Vilber Lourmat, Avustralya)

2.2. Metot

2.2.1. Örneklerden *Staphylococcus aureus*'un İzolasyon ve İdentifikasyonu

Aseptik koşullarda toplanan ve soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılan kaymak numunelerinin her biri öncelikle kendi kabı içerisinde homojenize edildi. Ön zenginleştirme amacıyla her bir kaymak örneğinden 10 g alınarak, içerisinde 90 ml BHIB (Brain Heart Infusion Broth) bulunan tüplere kaymaklar aktarıldı. Brothlar, 37 °C'de aerobik koşullarda 24-48 saat inkube edildi. İnkubasyon işlemi sonrası deney tüplerindeki örnekler ilk önce vorteks yardımıyla karıştırıldı ve homojenize edildi. İşlemin sonunda her bir ön zenginleştirme sıvısından öze yardımıyla alındı ve içerisine üretici firmanın önerisi doğrultusunda Egg-yolk tellurite emülsiyonu eklenmiş (50 mL/1 L) Baird Parker agara ve ayrıca Tryptone soy agara ekim işlemleri yapıldı. Ekim yapılan petriler 37 °C'de aerobik koşullarda 24-48 saat inkube edildi (Pamuk vd., 2012). İnkubasyon süresi sonunda agarda üremiş etrafi mat ve donuk bir zonla çevrili gri-siyah renkli en az beş koloni ürettiği belirlenen örnekler, *S. aureus* yönünden şüpheli olarak kabul edilerek bu kolonilerin koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği, oksidaz, lamda ve tüpte katalaz, lamda ve tüpte koagulaz aktiviteleri, glukozun fermentasyonu ile mannitolün anaerobik fermentasyonu testleri yapıldı (Quinn vd., 2004; Arda, 2011; Gezgen ve Seker, 2016). Standart biyokimyasal testleri takiben *S. aureus* olarak identifiye edilen suşlar, daha sonra DNA ekstraksiyonu ve *mecA* ve *pvl* genlerinin belirlenmesi

amacıyla gerçekleştirilecek olan PZR testlerinde kullanılmak üzere, %15 oranında gliserin içeren Trypticase soy broth içerisinde -20 °C’de saklandı.

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

2.2.2.1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada metisiline direnç geni ve *pvl* toksin geni pozitif kontrol suşları ve elde edilen *S. aureus* test suşlarından DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı. Kaynatma yöntemi için kontrol suşları uşları ve test suşlarının TSA’da üremiş olan taze ve saf kolonilerinden birer tane seçilerek, koloniler içerisinde 500 µl steril distile su bulunan ependorflar (DNaz-RNaz içermeyen) içerisinde süspanse edildi. Elde edilen süspansiyonlar 100 °C’de benmari usulü 10 dk kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan süspansiyonlar 10.000 rpm’de (9167 g) 5 dk santrifüj edildi Santrifüj sonrası her bir süpernatanttan 300 µl alınıp DNaz-RNaz içermeyen epondorf tüplerine aktarıldı ve PZR karışımında hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20⁰ C’de muhafaza edilmek üzere saklandı (Garipcin ve Seker, 2015; Gezgen ve Seker, 2016).

2.2.2.2. Amplifikasyon Koşulları

Çalışmada *Staphylococcus* cins spesifik 16S rDNA ve *mecA* genlerinin belirlenmesinde ikili PZR protokolü, *pvl* toksin geninin belirlenmesi için ise tekli PZR protokolü kullanıldı. Kullanılan primer dizileri, beklenen bant büyüklükleri ve primerlerin önerildiği kaynaklar Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Kullanılan primerlere ait oligonükleotid sekansları, bant büyüklükleri ve referanslar

Hedef Genler		Oligonükleotid Sekanslar (5'-3')	Bant Büyüklüğü (bp)	Referans
16S rDNA	Forward	CAGCTCGTGTCTGAGATGT	420	Strommenger ve ark., 2003
	Reverse	AATCATTTGTCCACCTTCG		
mecA	Forward	CCTAGTAAGCTCCGGAA	314	Choi ve ark., 2003
	Reverse	CTAGTCCATTTCGGTCCA		
Pvl	Forward	ATCATTAGGTAATGTTCTGGGACATGATCA	433	Lina ve ark., 1999
	Reverse	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC		

Final hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlanan PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları 16 sRNA ve *mecA* genleri için Çizelge 2.3'de, *pvl* geni için Çizelge 2.4'de gösterilmiştir. DNaz ve RNaz bulunmayan mini PZR tüplerine 20'şer µl olarak dağıtılan PZR karışımlarının üzerine 5'er µl hedef DNA eklendi ve karışımlar vortekslendi. Tamamlanan reaksiyon karışımları için uygulanan amplifikasyon koşulları Çizelge 2.5'de sunulmuştur. Ethidium bromid (5µl/ml) ile boyanan %1,5 lik agaroz jelde 100 volt sabit akımda 60 dk elektroforeze tabi tutulan amplifikasyon ürünleri UV-transilluminatörde görüntülendi.

Çizelge 2.3. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (16s rDNA ve *mecA*)

PZR Bileşenleri	Miktarları
10XPCR buffer	2,5 µl
dNTP karışımı	0,5 µl
MgCl ₂	3 µl
16S rDNA-F	0,1 µl
16S rDNA-R	0,1 µl
mecA-F	0,1 µl
mecA-R	0,1 µl
Taq DNA polimeraz (IU)	0,2 µl
Distile Su	13,4 µl

Çizelge 2.4. PZR karışımını oluşturan bileşenler ve miktarları (*pvl*)

PZR bileşenleri	Miktarları
10XPCR buffer	2,5 µl
dNTP karışımları	0,5 µl
MgCl ₂	3 µl
Primer-F	0,1 µl
Primer-R	0,1 µl
Taq DNA polimeraz (IU)	0,2 µl
Distile su	13,6 µl

Çizelge 2.5: 16s rDNA, *mecA*, *pvl* genleri için uygulanan amplifikasyon koşulları

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık		Süre	
		<i>mecA</i> 16S rDNA	<i>pvl</i>	<i>mecA</i> 16S rDNA	<i>pvl</i>
Ön Denatürasyon	1	95 °C	95 °C	5 dk	5 dk
Denatürasyon	30	95 °C	94 °C	2 dk	1 dk
Primer Bağlanması	30	54 °C	62 °C	1 dk	30 sn
Uzama	30	72 °C	72 °C	2 dk	1 dk
Son uzama	1	72 °C	72 °C	7 dk	5 dk

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

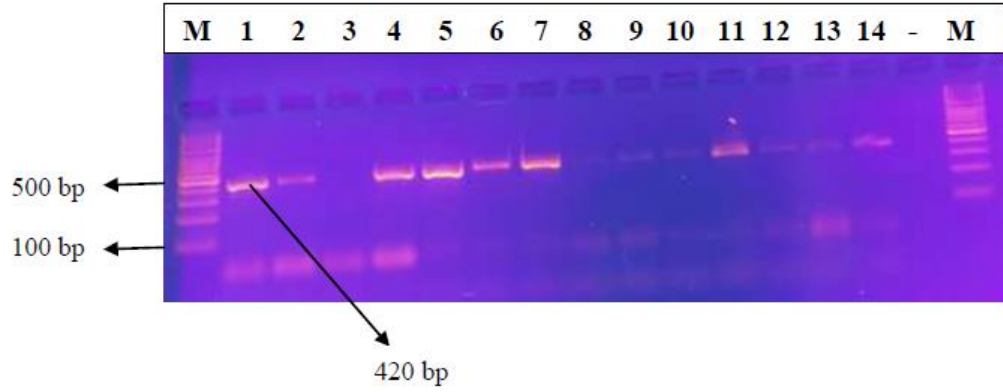
Sunulan çalışmada; Afyonkarahisar ili Merkez ve diğer ilçe ve köylerde ev tipi üretimi yapılan ve halk pazarlarında satışa sunulan manda kaymağı, inek kaymağı ve manda-inek sütünün karışımından yapılan toplam 110 adet kaymak örneği *S. aureus* izolasyonu yönünden incelendi. Klasik ekim yöntemleri ve kolonilere *S. aureus* identifikasyonu için uygulanan biyokimyasal testler sonrasında 110 adet kaymak örneğinin 14'ünden *S. aureus* izolasyon ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Böylece çalışmada klasik yöntemler kullanılarak elde edilen *S. aureus* izolasyon oranı %12,7 olarak bulundu.

Kaymak örneklerinden identifiye edilen 14 suştan yedisinin inek sütü orijinli, beşinin manda sütü orijinli ve ikinin de inek ve manda sütünün karışımıyla yapılmış kaymaklardan elde edildiği belirlendi.

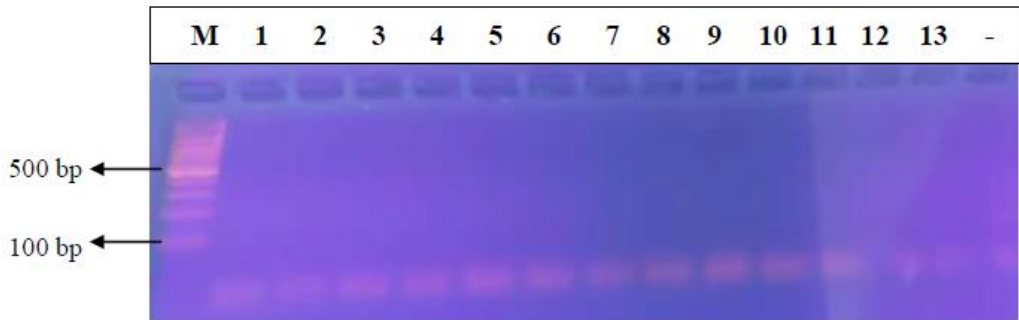
3.2. PZR Bulguları

Toplam 110 kaymak numunesinden identifikasyonu klasik kültürel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen 14 adet *S. aureus* suşuna uygulanan ikili PZR sonuçlarına göre; suşlardan 13'ünün 16S rDNA genine sahip olduğu, ancak hiç birinin *mecA* geni taşımadığı belirlendi. Ayrıca, PZR ile *S. aureus* olarak tiplendirilen 13 adet suşun hiç birinde *pvl* toksin genine de rastlanmadı. Toplam 110 kaymak numunesinden PZR ile *S. aureus* izolasyon oranı %11,8 olarak bulundu. Klasik yöntemlerle inek sütü orijinli kaymaklardan izole edilen suşlardan birisi PZR ile *S. aureus* olarak doğrulanmadı. Böylece, kaymak örneklerinden PZR ile identifiye edilen 13 suştan altısının inek sütü orijinli kaymak numunesine ait olduğu belirlendi. Suşlarda *Staphylococcus* spesifik 16S rDNA ve *mecA* genlerinin araştırıldığı jel

görüntüsü Şekil 3.1'de, *pvl* toksin geninin araştırıldığı jel görüntüsü ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Resim 3.1: 16S rDNA ve *mecA* genlerine ait PZR bulguları. M: DNA ladder (100 bp); sütun 1,2,4-14: 16S rDNA pozitif *S. aureus* test suşları (420 bp); sütun 3: 16S rDNA negatif test suşu; sütun 1-14: *mecA* negatif *S. aureus* test suşları; -: steril distile su



Resim 3.2: *pvl* geninin araştırıldığı jel görüntüsü. M: DNA ladder (100 bp); sütun 1-13: *pvl* geni negatif *S. aureus* suşları; -: steril distile su

4. TARTIŞMA

En az %60 süt yağı içeren krema olan kaymak, geleneksel üretimde sütün tekniğine uygun olarak kaynatılıp soğutulması sonucu elde edilen, hafif asidik tatta, kremesi yapıda olan süt ürünüdür. Geleneksel olarak evlerde üretimi yapılan manda kaymağı manda sütünden üretilmektedir. Türkiye’de asıl olarak Afyonkarahisar’da ve çevresinde, ayrıca Orta Anadolu’da manda sütünden yapılırken, Afyonkarahisar’ın doğusunda inek sütünden de yapılmaktadır (Kocatürk vd., 2019; Albay vd., 2021). Ülkemizde özellikle ilimiz Afyonkarahisar’da yaygın olarak tüketilen kaymağın geleneksel yöntemlerle evlerde ve endüstriyel yöntemlerle süt işletmelerinde üretimi devam etmekte (Kocatürk vd., 2019) olup, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; 2018 yılında 32877 ton olarak hesaplanmış olan kaymak üretimi, 2019 yılında 39006 ton olarak hesaplanmıştır. Ayrıca kaymak üretimi, 2020 yılında 2019 yılına göre Mayıs ayında %17 ve Ocak-Mayıs döneminde %1,6 artmıştır (TÜİK, 2020).

Geleneksel bir süt ürünü olan ve özellikle Afyonkarahisar'da Afyon kaymağı olarak da bilinen, asıl orijinini manda sütünden alan kaymak, hem üretildiği bölgeye hem de ülke ekonomisine fayda sağlayan ve yüksek tüketici payına sahip bir üründür. Bu nedenle de, kaymağın mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesine yönelik çeşitli araştırmalar yapıldığı görülmektedir (Sağun vd., 2001; Yılsay ve Bayizit, 2002; Akalın vd., 2006, Pamuk vd., 2012; Saka ve Terzi Gulel, 2018). Van'da kahvaltı salonlarında tüketime sunulan süt ürünlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitelerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, örneklenen 10 kaymak örneğinin ikisinden (%20) *S. aureus* izole edildiği bildirilmiştir (Sağun vd., 2001). Yılsay ve Bayizit (2002) tarafından Bursa'da tüketilen kaymakların mikrobiyolojik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, 30 kaymak örneğinin 26'sında *Staphylococcus* spp. izolasyonu bildirilmiş, ancak etkenler tür bazında tiplendirilmemiştir. Afyonkarahisar'da manda kaymaklarından *S. aureus* izolasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada, 120 adet manda kaymağının 26'sından (%21,6) *S. aureus* izolasyonu bildirilmiştir (Pamuk vd., 2012). Samsun'da manda sütü, manda kaymağı ve manda peynirlerinde *S. aureus* varlığını araştıran bir

çalışmada, örneklenen 50 manda kaymağından *S. aureus* izolasyon oranı %18 (n=9) olarak rapor edilmiştir (Saka ve Terzi Gulel, 2018). Aydın vd. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada, Marmara Bölgesi'nde tüketime sunulan peynir, tereyağı, yoğurt ve kaymak örneklerini içeren 452 adet süt ürününün 54'ünden (%11,9) *S. aureus* izole edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, Kasım 2019 ve Aralık 2020 tarihleri arasında Afyonkarahisar ili merkez ilçe ve diğer ilçelerde bulunan halka açık pazar yerlerinden ve üreticilerin evlerinden toplanan toplam 110 adet ev yapımı kaymak örneği *S. aureus* varlığı yönünden incelendi. Klasik yöntemler kullanılarak yapılan izolasyon çalışmasında 110 kaymağın 14'ünden *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilirken, PZR ile yapılan identifikasyon sonrasında 14 izolatın 13'ü *S. aureus* olarak doğrulandı. Buna göre çalışmamızda toplam 110 kaymak örneğinden *S. aureus* izolasyon oranı %11,8 olarak bulundu. Kaymak örneklerinden PZR ile identifiye edilen 13 suştan altısının inek sütü orijinli, beşinin manda sütü orijinli ve ikinin de inek ve manda sütünün karışımıyla yapılmış kaymaklardan elde edildiği belirlendi. Çalışmada elde edilen izolasyon oranı, diğer araştırmacıların (Sağun vd., 2001; Pamuk vd., 2012; Saka ve Terzi Gulel, 2018) bulgularından daha düşüktü. Bunun nedeninin, örneklemenin yapıldığı coğrafik bölge, örnek sayısı, örnekleme sürecindeki mevsimsel farklılıklar ve kullanılan izolasyon ve identifikasyon yöntemlerindeki farklılıklarla ilişkili olabileceği düşünüldü. Çalışmamızda ayrıca, *S. aureus* izolasyonu gerçekleştirilen kaymakların, İhsaniye ilçesi Gazlıgöl beldesi ve Sinanpaşa ilçesi Akören beldesinde yapılıp satışı sunulan kaymaklar olduğu tespit edildi. Sunulan çalışmada elde edilen %11,8'lik izolasyon oranı düşük olmakla birlikte, gıda maddelerinde ya da gıda işletmelerinde bu bakteriye rastlanması kişisel hijyen uygulamasında aksaklık olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tunail, 2000).

Günümüzde antibiyotiklerin fazla, gereksiz ve hatalı kullanımının yaygınlaşması, insan ve hayvan orijinli *S. aureus* suşlarının tedavi amaçlı kullanılan ilaçlara karşı direnç geliştirmelerine neden olmaktadır. Bu direnç mekanizmalarından birisi son yıllarda önemle üzerinde durulan ve *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a sentezi ile ilişkilendirilen metisilin direncidir. MRSA infeksiyonları tüm dünyada

hem halk sağlığı hem de hayvan sağlığını ilgilendiren önemli bir sorun haline dönuşmuştür. MRSA suşlarının yayılmasında hayvansal orijinli gıdaların da aracılık yaptığıının belirlenmesi, araştırmaların bu yöne çevrilmesine neden olmuştur (Pamuk vd., 2012; Wang vd., 2015; Gezgen ve Seker, 2016; Basanisi vd., 2017; Saka ve Terzi Gulel, 2018). Ancak, genellikle yapılan çalışmaların mastitisli sütler ya da et ve et ürünleri üzerinde yoğunlaştığı, kaymaklardan MRSA izolasyonuna yönelik ise sınırlı sayıda araştırma olduğu dikkati çekmiştir (Pamuk vd., 2012; Saka ve Terzi Gulel, 2018). Basanisi vd. (2017) tarafından yapılan bir araştırmada 3760 adet süt ve süt ürünü örneğinden elde edilen 484 *S. aureus* izolatından 40'ının (%8,3) genotipik olarak MRSA olduğu tespit edilmiştir. İtalya'da süt ve süt ürünleri ile et ve et ürünlerini içeren 1634 gıda örneğinden izole edilen 160 *S. aureus* suşunun altısının (%3,7) *mecA* geni taşıdığı ve MRSA suşlarının tamamının çiğ süt ve peynirlerden elde edildiğı vurgulanmıştır (Normanno vd., 2007). Türkiye'de Doğan vd. (2016) tarafından mastitisli ruminant sütlerinden izole edilen 177 *S. aureus* suşunun 45'inde (%25,4) *mecA* geni belirlendiğı bildirilmiştir. Afyonkarahisar'da 120 adet manda kaymağından izole edilen 26 *S. aureus* suşunun 9'unda *mecA* pozitifliğı belirlenmiştir (Pamuk vd., 2012). Saka ve Terzi Gulel (2018) tarafından Samsun'da örneklenen 50 manda kaymağından izole edilen 9 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *mecA* geni bulunamadığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada, 110 kaymak örneğinden izole edilen 13 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *mecA* geni bulunmadı. Bazı araştırmacılar, hayvansal gıda orijinli MRSA suşlarının prevalansının hastane ve toplumsal kaynaklı MRSA suşlarına oranla oldukça düşük düzeyde tespit edildiğini bildirmektedir (Normanno vd., 2007; Saka ve Terzi Gulel, 2018; Yılmaz, 2019). Ayrıca, örneklerin elde edildiğı hayvanların antibiyotik kullanım geçmişleri, suşların orijini, test edilen suş sayısı ve coğrafik farklılıkların da elde edilen bu sonuçta etkili olabileceğı düşünöldü.

Panton-Valentine lökosidin toksini, özellikle insanlardaki *S. aureus* infeksiyonlarının patogeneğinde önemli olduğu düşünölen, hem metisiline duyarlı hem de metisiline dirençli *S. aureus* suşları tarafından üretilebilen bir virulans faktörüdür. Bu toksinin insan infeksiyonlarındaki rolü açıklık kazanmakla birlikte, *S.*

aureus'un hayvanlarda neden olduğu infeksiyonlardaki görevi tam olarak açıklanamamıştır (Rainard vd., 2003; Lo ve Wang, 2011). *S. aureus* suşlarında *pvl* geninin varlığına yönelik yapılan çalışmaların büyük bir kısmı mastitisli ruminant sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşları üzerinde yoğunlaşmıştır. Zecconi vd. (2006) tarafından yapılan bir araştırmada mastitisli inek sütlerinden izole edilen 50 *S. aureus* suşunda *pvl* geni pozitifliği %56 (n=28) olarak bildirilmiştir. Fueyo vd. (2005) mastitisli inek sütlerinde yapmış olduğu araştırmada izole edilen *S.aureus* suşlarında hiç *pvl* geni tespit etmediklerini belirtmişlerdir. Ikawaty vd. (2010) Hollanda'da yapmış oldukları çalışmada mastitisli inek sütlerinden izole edilen 76 *S.aureus* suşunun hiçbirinde *pvl* genine rastlamamışlardır. Türkiye'de Hazımoğlu (2011) subklinik mastitisli inek sütlerinden izole ettiği 18 MRSA suşunun sadece birinde *pvl* geni belirlemiştir. Kaynarca ve Türkyılmaz (2010) tarafından Aydın ilinde yapılan bir çalışmada, sığır sütü orijinli 16 MRSA izolatının hiçbirinde *pvl* genine rastlanmadığı bildirilmiştir. Gezgen ve Seker (2016) İzmir'de mastitisli ineklerden izole ettikleri 60 *S. aureus* suşunun hiçbirinin *pvl* geni taşımadığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Afyonkarahisar'da yapılan bir başka çalışmada da mastitisli süt örneklerinden izole edilen 23 *S. aureus* suşunun hiç birinde *pvl* geni belirlenemediği vurgulanmıştır (Yılmaz, 2019).

Sunulan çalışmada, Afyokarahisar'da üretilen kaymaklardan izole edilen *S. aureus* suşlarında *pvl* toksin geni varlığı Türkiye'de ilk kez araştırıldı. Ancak izole edilen 13 *S. aureus* suşunun hiçbirinde *pvl* geni bulunamadı. Çalışmada izole edilen suş sayısının azlığının bu sonucun elde edilmesinde etkili olabileceği düşünüldü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da ev tipi üretimi yapılan ve satışa sunulan kaymaklardan izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin ve Panton-Valentine Lökosidin genlerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, halk pazarlarından toplanan toplam 110 adet kaymak örneğinin 13'ünden (%11,8) PZR ile *S. aureus* identifiye edildi. Ancak, suşların hiçbirinde *mecA* ve *pvl* geni tespit edilmedi.

Çalışmada örneklenen kaymaklardan elde edilen *S. aureus* izolasyon oranı düşük olmakla birlikte, bu bakterinin özellikle gıdalarda ve gıda endüstrisinde belirlenmesinin kişisel hijyen yetersizliğinden kaynaklanabildiği unutulmamalıdır. Ayrıca, mastitisli hayvanların sütlerinden yapılan çeşitli ürünlerde de *S. aureus* bulunabilmekte, bu durum da halk sağlığı açısından potansiyel bir tehlike oluşturabilmektedir. Bu nedenle insan tüketimine sunulan kaymakların üretim ve depolama şartlarının iyileştirilmesi önem arz etmektedir.

Sunulan çalışmada, izole edilen *S. aureus* suşlarında *mecA* ve *pvl* genlerinin varlığına rastlanmaması, izole edilen suş sayısının azlığı ile açıklanabilir. Bununla birlikte, özellikle *mecA* genlerinin hayvansal orijinli gıdalardan izole edilen *Staphylococcus* suşları aracılığı ile insanlara aktarılabilir özellikte olması gözardı edilmemesi gereken bir konudur. Bu nedenle de, geleneksel bir ürün olan kaymaklarda bu gen varlığını araştıran çalışmalara ağırlık verilmesinin gerekli olabileceği düşünüldü. Ayrıca, bu çalışmada Türkiye'de ilk kez kaymak örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *pvl* toksin geni varlığı araştırıldı. Suşların hiçbirisi bu toksin genine sahip olmamakla birlikte, kaymak ve diğer süt ürünlerinde bu toksin geninin belirlenmesine yönelik çalışmaların da ivme kazanmasının, bu ürünlerde *pvl* gen prevalansının ortaya çıkarılmasına katkı sağlayabileceği düşünüldü.

6. KAYNAKLAR

- Akan, M. (2006). *Staphylococcus aureus* İnfeksiyonları, In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Eds: Aydın, N., Paracıklıoğlu, J. İlke-Emek Yayınları, Ankara, sy:6-12
- Akalın, S. A., Gönç, S., Ünal, G., Ökten, S. (2006). Determination of some chemical and microbiological characteristics of kaymak. *Grasas Y Aceites*, 57 (4): 429-432.
- Akarca, G., Tomar, O. (2018). Afyonkarahisar'da Satışa Sunulan Afyon Kaymaklarının Mikrobiyolojik Özellikleri. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 14: 102-109.
- Albay, Z., Çapa, E., Şimşek, B., Yıldırım, K. (2021). Some chemical, microbiological, textural and sensory properties of traditional dry clotted cream (Kuru Kaymak). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(3): 484-492
- Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G., Procop, G. (2006). The Gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 539- 576.
- Alışarlı, M., Sancak, Y. C, Akkaya, L., Elibol, C. (2003). Bazı sütlü gıdalarda *Staphylococcus aureus*'un izolasyonu, termonükleaz aktivitesi ve enterotoksijenik özelliklerinin araştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27: 1457-1462.
- Aydın, 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. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 99-106.
- Barber, M. (1961). Methicillin-resistant Staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 14: 385-389.
- Basanisi, M. G., La Bella, G., Nobili, G., Franconieri, G., La Salandra, G. (2017). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated, from milk and dairy products in South Italy. *Food Microbiology*, 62: 141-146.
- Berkiten, R. (2005). Staphylococcus. Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Ed: Bozkaya, E. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 3-11.
- Bohach, G. A., Foster, T. J. (2000). *Staphylococcus aureus* exotoxins, Gram positive pathogens. Ed: Fischetti, V.A., Novick, R.P., Ferretti, J.J., Portnoy, D.A., Rood, J.I. American Society Microbiology Press, Washington, D.C. 367-379.
- Boyle-Vavra, S., Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*, 87: 3-9.
- Cengiz, A.T. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed. Ustaçelebi, S. Güneş Kitabevi, Ankara, 339-348.

- Choi, S.M., Kim, S.H., Kim, H.J., Lee, D.G., Choi, J.H., Yoo, J.H., Kang, J.H., Shin, W.S., Kang, M.W. (2003). Multiplex PCR for detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among *Staphylococcus* species. *Journal of Korean Medical Science*, 18(5): 631-636.
- Christensen, G. D., Baldassarri, T., Simpson, W. A. (1994). Colonization of medical devices by coagulase-negative *Staphylococci*. Eds: Bisno A.L., Waldvoget F. A. Infections associated with indwell, medical devices. *American Society for Microbiology*, Washington DC. 45-78.
- Cookson, B., Scmitz, F. J., Fluit A. C. (2003). Introduction to MRSA. In: MRSA current perspective. Eds. A.C. Fluit, F.J. Schmitz. Horizon Scientific Press, 340.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 16-34.
- Doğan, E., Kılıç, A., Türütoğlu, H., Öztürk, D., Türkyılmaz, S. (2016). Screening of *Staphylococcus aureus* isolates for *mecA* and *mecC* genes carriage. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63: 389-391.
- Fluit, A.C., Schmitz, F.J. (2003). MRSA: current perspectives. Norfolk: Caister Academic Press.
- Fong, I.W., Kolia, M. (2003). MRSA in the 21st century: emerging challenges. Ed: Fongand Karl Darlica. Reemergence of established pathogens in the 21st century. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 99-138.
- Franklin, D.L. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. 32: 339-520.
- Fueyo, J. M., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R., Muñoz, J., Alvarez, M. A., Martín, M. C. (2005). Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3): 1278-1284.
- Garipcin, M., Seker, E. (2015). Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cattle and farm workers in Turkey. *Veterinarski Arhiv*. 85(2): 117-129.
- Gezgen, C., Seker, E. (2016). Investigation of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44: 1373.
- Hart, M.E., Hart, M. J., Roop, A. J. (2009). Genotypic and phenotypic assessment of hyaluronidase among type strains of a select group of staphylococcal species. *International Journal of Microbiology*, 614371.
- Hartman, B. J., Tomasz, A. (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 158: 513-516.

- Hazımoğlu, Ş. (2011). *Staphylococcus aureus* suşlarında Pantan-Valentine lökositidin (PVL) genlerinin araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s94, Aydın,
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Ikawaty, R., Brouwer, E. C., Wan Duiskeren, E., Mevius, D., Verhoef, J. (2010). Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. *International Journal of Dairy Science*, 5(2): 60-70.
- İlgaz, A., Ak, S., Özgür, Y., İkiz, S. (2011). Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi, Hayvan Hastalığı Etkeni Olan Bakteriler Ve Mantarlar. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 35-42.
- Jevons, M. P. (1961). Celbenin-resistant Staphylococci. *British Medical Journal*, 124: 124-126.
- Jevons, M. P., Coe, A. W., Parker, M. T. (1963). Methicillin resistant in *Staphylococci*. *Lancet*, 1: 904- 907.
- Johansson, A., Flock, J.I, Svensson, O. (2001). Collagen and fibronectin binding in experimental *staphylococcal* osteomyelitis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 382: 241-246.
- Jonsson, K., Signas, C., Muller, H. P., Lindberg, M. (1991). Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus* The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *European Journal of Biochemistry*, 202: 1041-1048.
- Kaynarca, S., Türkyılmaz, S. (2010). Sığır mastitislerinden izole edilen Stafilokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(4): 567-572.
- Kloos, W. E., Bannerman, T.L. (1999). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Manual of Clinical Microbiology. Ed: Murray, P.R., American Society for Microbiology Pres, Washington DC, 264-277.
- Kocatürk, K., Gökçe, Ö., Ergin, F., Küçükçetin, A., Gürsoy, O. (2019). Geleneksel yöntemlerle üretilen ve manda kaymağı olarak pazarlanan ürünlerin bazı özellikleri ile konjuge linoleik asit içerikleri. *Akademik Gıda*, 17(4): 476-484.
- Konaç, Y. (2006). Beyaz peynir örneklerinde *Staphylococcus aureus*'un farklı selektif besiyerlerinde sayımı ve tanımlanması, Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 63, Ankara.
- Kurt, A., Özdemir, S. (1988). Erzurum'da yapıp satılan kaymakların bileşimi ve mikrobiyolojik kalitesi, *Gıda*, 13(3): 205-208.
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64: 357-372.

- Lina, G., Pie'mont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Disease*, 29: 1128-1132.
- Lo, W., Wang, C. (2011). Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatrics and Neonatology*, 52: 59-65.
- Lowy, F. D. (1999). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, 339 (8): 520-532.
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111: 1265-1273.
- Lyon, B. R., Gillespie, M. T., Byrne, M. E., May, J. W., Skurray, R. A. (1987). Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*: the involvement of a transposon. *Journal of Medical Microbiology*, 23: 101-110.
- Marth, E. H., Halpindohnalek, M. I. (1989). Growth and production of enterotoxin-A by *Staphylococcus aureus* in cream. *Journal of Dairy Science*, 72: 2266-2275.
- Matsushashi, M., Song, M. D., Ishino, F., Wachi, M., Doi, M., Inoue, M., Ubukata, K., Yamashita, N., Konno, M. (1986). Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 167: 975-80.
- Meyer, F., Girardot, R., Piemont, Y., Prevost, G., Colin, D. A. (2009). Analysis of the specificity of Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infection and Immunity*, 77: 266-273.
- Monecke, S., Slickers, P., Ellington, M.J., Kearns, A.M., Ehrlich, R. (2007). High diversity of Panton-Valentine leukocidin-positive, methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for the evolution of community-associated methicillin-resistant *S. aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(12): 1157-1164.
- Moreillon, P. Que, Y. Glauser, M. P. (2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Elsevier Inc, 2321-2352.
- Normanno, G., Corrente, M. La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia N.C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 219-222.
- Ogston, A. (1881). Report upon microorganisms in surgical diseases. *British Medical Journal*, 1: 369-370.
- Oldberg, A., Franzen, A., Heinegard, D. (1988). The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 19430-19432.

- Otto, M. (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology*, 17: 32-37.
- Pamuk, S., Yıldırım, Y., Seker, E., Gürlü, Z., Kara, R. (2012). A survey of the occurrence and properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* in water buffalo milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, 65: 416-422.
- Patti, J.M., Bremell, T. Krajewska-Pietrasik, D., Abdelnour, A., Tarkowski, A., Rydén, C., Höök, M. (1994). The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infection and Immunity*, 62: 152-161.
- Peacock, S.J., (2006). *Staphylococcus aureus*. In: Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Eds.: Gilgipe, S.H., Hawkey, P.M., John Wiley & Sons Ltd., England; 73-98.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Harcourt Publishers Limited, London:118-126
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C., Leonard, F.C. (2004). Veterinary Microbiology and Microbiol Disease. Blackwell Publishing Professional, Iowa:43-48.
- Rainard, P., Corrales, J.C., Barrio, M.B., Cochard, T., Poutrel, B. (2003). Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes and goats with mastitis: Importance of LukM/LukF-PV leucotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(2): 272-277.
- Richardson, J.F., Aparicio, P., Marples, R.R., Cooksoon, B.D. (1994). Ribotyping of *Staphylococcus aureus*: an assessment using well-defined strains. *Epidemiology and Infection*, 112: 93-101.
- Rolo, J., Worning, P., Nielsen, J. B., Sobral, R., Bowden, R., Bouchami, O., Damborg, P., Guardabassi, L., Perreten, V., Westh, H., Tomasz, A., Lencastre, H., Miragaia, M. (2017). Evidence for the evolutionary steps leading to *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci, *Plos Genetics*, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006674>
- Rosenbach, F. J. (1884). Mikro-organismen bei den Wund-infektions-Krankheiten des Menschen. Wiesbaden, Germany: Wiesbaden Joseph Friedrich Bergmann: 9-21
- Sağun, E., Sancak, H., Durmaz, H. (2001). Van'da kahvaltı salonlarında tüketime sunulan süt ürünlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kaliteleri üzerine bir araştırma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12 (1-2): 108-112.
- Shanson, D. C. (1961). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Hospital Infection*. 2: 11-36.
- Saka, E., Terzi Gülel, G. (2018). Detection of enterotoxin genes and methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from water buffalo milk and dairy products. *Journal of Food Science*, 83(6): 1716-1722.

- Sandel, M. K., Mc Killip, J. L. (2004). Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, 15: 5-10.
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., Witte, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *S. aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9): 4089-4094.
- TGK (2003). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Krema ve Kaymak Tebliği, T.C. Resmî Gazete, 27 Eylül 2003, Sayı: 25242.
- Timbury, M.C., Mc Cartney, A., Thakker, B. (2002). Notes on Medical Microbiology. Churchill Livingstone. Elsevier Limited, New York, USA, 31-34.
- Todar, K. (1994). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.
- Tuna, D.K., Akyüz, S., Parlak, M., Güdücüoğlu, H. (2020). Portörlerde burunda *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı, *mecA* ve Panton-Valentine lökositin varlığının araştırılması. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(3): 38-43.
- Tunail, N. (2000). Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık Ltd., Ankara, 81-184.
- Tükel, Ç., Doğan, H. B. (2000). *Staphylococcus aureus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık Ltd., Ankara, 357-366.
- Ünal, S. (1996). Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri, *Flora Dergisi*, 1: 14-17.
- Valeva, A., Walev, I., Pinkernell, M., Walker, B., Bayley, H., Palmer, M., Bhakdi, S. (1997). Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 1607-1611.
- Vandenesch, F., Lina, G., Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bicomponent leukocidins, and cytolytic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2: 15.
- Wang, D., Wang, Z., Yan, Z., Wub, J., Ali, T., Li, J., Lv, Y., Han, B. (2015). Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 31: 9-16.
- Wilke, G.A., Bubeck Wardenburg, J. (2010). Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 107: 13473-13478.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. New York, Lippincott Williams Wilkins, 623-671.

- Wu, S., Huang, J., Zhang, F., Wu, Q., Zeng, J., Pang, R., Haiyan, Z., Yang, X., Chen, M., Wang, J., Dai, J., Xue, L., Lei, T., Wei, X., (2019). Prevalence and characterization of food-related methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in China. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00304>
- Yacoub, A., Lindahl, P., Rubin, K., Wendel, M., Heinegard, D., Ryden, C. (1994). Purification of a bone sialoprotein-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry*, 222: 919-925.
- Yılmaz, M. (2019). Sığır Mastitislerinde İzole Edilen *Staphococcus aureus* Suşlarında Metisilin, Vankomisin Direnci ve Panton-Valentine Lökosidin Varlığının Araştırılması, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi, 57s, Afyonkarahisar.
- Yılsay, T .Ö., Bayizit, A. (2002). Bursa ilinde tüketilen kaymakların mikrobiyolojik özellikleri ve bazı patojen bakterilerin aranması. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16: 77-86.
- Yüce, A. (1992). İzmir Yöresindeki Mandıralardan Alınan Çiğ Sütlerde *Salmonella*, *S. aureus* ve *Listeria monocytogenes* aranması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 17s, İzmir.
- Yüksekdağ, Z. N., Baltacı, N. (2013). *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 43(3): 77-83.
- Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Daprà, V., Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, 40(4): 177-183.