

Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği*

Erhan KEYVAN¹, Haydar ÖZDEMİR²

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Burdur; ²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Özet: Bu çalışma, sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı ile izolatların enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliğini belirlemek için yapılmıştır. Bu amaçla, Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahadaki 120 adet sığır karkasından alınan örnekler materyal olarak kullanılmıştır. Örnekler aseptik koşullarda her bir sığır karkasının but, kavram ve döş bölgelerinin 100 cm² lik (10×10 cm) alanından (toplam 300 cm²) sünger swab tekniği ile alınmıştır. Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucu, 120 sığır karkas örneğinin 15'i (%12,5) *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur. *S. aureus* olarak belirlenen 22 izolatın 19'unun (%86,3) ise enterotoksijenik özellikte olduğu belirlenmiştir. Enterotoksijenik izolatların 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. 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 yüksek oranda dirençli olduğu, vankomisine ise tümünün duyarlı olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, sığır karkaslarında *S. aureus*, 15 örnekte (%12,5) bulunmuş olup, izolatların 19'u (%86,3) enterotoksijenik özelliktedir. Bu nedenle sağlıklı sığır eti üretimi ve halk sağlığının korunması için mezbahalarda etkin HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) sisteminin uygulanması önemlidir.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal direnç, PCR, sığır karkas, stafilkokal enterotoksin, *S. aureus*.

Occurrence, enterotoxigenic properties and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* on beef carcasses

Summary: The objectives of this study were to determine the incidence, enterotoxigenic properties and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*. For this purpose, 120 beef carcass samples, obtained from 2 different slaughterhouses in Ankara. All samples were collected to each of carcass regions of rump, flank and brisket per 100 cm² (10 × 10 cm, a total of 300 cm²) under aseptic conditions with sponge swab technique. Results of microbiological examinations, 15 (12.5%) of the 120 beef carcasses samples were confirmed as *S. aureus*. 19 (86,3 %) out of 22 *S. aureus* isolates determined as enterotoxigenic. 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. 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. All of the isolates were sensitive to vancomycin. As a conclusion, it was found that beef carcasses contaminated with *S. aureus* 15 (12.5%) and enterotoxigenic *S. aureus* level is relatively high 19 (86.3%). It is therefore recommended that slaughterhouses introduce internal hygiene measures such as the HACCP system in order to produce beef meat of good quality and thus protect public health.

Key words: Antimicrobial resistance, beef carcass, PCR, staphylococcal enterotoxin, *S. aureus*.

Giriş

Staphylococcus aureus insan ve hayvanlarda önemli enfeksiyon ve bakteriyemilere yol açan bir patojendir. Etken gıdalarda yaygın olarak bulunduğu için, gıda kaynaklı intoksikasyonlarda önemli rol oynamakta ve dünyada rapor edilen gıda kaynaklı hastalıklar içerisinde üçüncü sırada yer almaktadır (18, 33).

S. aureus Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kapsül-süz, katalaz pozitif, kok şeklinde, 0,5-1,5 µm büyüklü-

ğünde olup, koagülaz, termonekroz ve hemolize sahip bir bakteridir (29). Isıya dirençli stafilkokal enterotoksinler (SE) etkenin patojenitesi bakımından önemli olup, değişik tiplerde enterotoksinleri (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *tst*) bulunmaktadır (23, 24). Ancak stafilkokal intoksikasyonların yaklaşık %95'inin SEA, SEB, SEC, SED ve SEE olarak tanımlanan klasik enterotoksinlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (24). Stafilkokal intoksikasyonlar, enterotoksin (20 ng <1µg) içeren

*Bu çalışma aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

gıdaların tüketimine bağlı olarak şekillenmekte ve semptomlar 0.5-6 saat (genellikle 2 saat) gibi kısa sürede ortaya çıkmaktadır (8).

Yapılan birçok çalışmada (23, 26, 27, 30) değişik hayvan türlerine ait etlerin değişik düzeyde *S. aureus* ile kontamine olduğu ve etkenin hem klasik hem de yeni tanımlanan (*seg, seh, sei, sej, sek* v.b) enterotoksin genlerine sahip oldukları rapor edilmiştir.

Antibiyotik dirençliliği günümüzde halk sağlığı açısından önemli sorunlardan olup, antibiyotik dirençliliğinin insanlara taşınmasında gıdaların önemli bir araç olabileceği belirtilmiştir. Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları tarafından oluşturulan infeksiyonlar, bugün tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir (31). Nitekim bu konuda yapılan çalışmalarda (16, 25) *S. aureus*'un başta penisilin olmak üzere sefalosporin, eritromisin, metisilin, oksasilin, tetrasiklin, kloramfenikol, gentamisin gibi çoğu antibiyotiğe karşı dirençli olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma, sığır karkaslarından sünger swap yöntemiyle alınan örneklerde; a) *S. aureus*'un klasik yöntemle izolasyon ve identifikasyonu, b) İzolatların PCR tekniği ile doğrulanması, c) Doğrulanmış *S. aureus* izolatlarında enterotoksin genlerinin PCR tekniği ile saptanması, d) İzolatların antimikrobiyal dirençliliklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Haziran 2011 ve Mayıs 2012 tarihleri arasında Ankara'da bulunan 2 farklı mezbahadaki, 120 adet sığır karkasından alınan örnekler materyal olarak kullanılmıştır.

Örneklerin alınması: Karkaslardan örnekler aseptik koşullarda sünger swaplar (Nasco Wirhl-Pak, USA) ile alındı ve örnekleme tekniğinde USDA/FSIS'in (2) önermiş olduğu yöntem kullanıldı. Bu amaçla farklı tarihlerde gidilen sığır kesimhanelerinde örnekler, yeni kesilmiş ve rastgele seçilmiş olan sığır karkaslarının steril bir şablon ile işaretlenen but, kavram ve döş bölgelerinin 100 cm²'lik (10x10) alanından (toplam 300 cm²) alındı. Steril poşetler içerisinde bulunan sünger swaplar, kullanmadan önce 10 ml peptonlu su ile sulandırılarak bir yüzüyle karkasın but ve kavram bölgesinden, diğer yüzüyle ise karkasın döş bölgesinden (10'ar kez yatay ve dikey pozisyonda sürülerek) örnekler alındı. Alınan örnekler aseptik koşullarda ve soğuk zincir altında laboratuvara getirildi.

***S. aureus*'un izolasyon ve identifikasyonu:** Sığır karkaslarından alınan sünger swap örnekleri üzerine 15 ml peptonlu su ilave edilerek, 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi takiben, karışımdan desimal dilüsyonlar hazırlanıp damla plak yöntemiyle, Baird Parker Agar'a (Merck, 1.03785, Egg yoluk Tellurit Emulsion, Merck, 1.05406) ekimleri yapıldı. Ekim son-

rası plaklar 35°C'de, 24-48 saat süreyle aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası besi yerinde üreyen tipik (gri-siyah renkte, parlak, konveks, 1-3 mm çapında, etrafında berrak zon oluşturan lesitinaz pozitif koloniler) ve/veya atipik kolonilerden 5 adet seçilerek EDTA koagülaz plazma (Merck, 1.13306) ile tüpte koagülaz testi yapıldı. Bunu takiben koagülaz testi pozitif olan koloniler Gram boyama, katalaz test, Dnase aktivitesi, β-hemoliz, clumping faktör (Staphylase test, Oxoid, DR0595) ve anaerob mannitol fermentasyon testi yönünden analiz edilip test sonuçları pozitif olan koloniler *S. aureus* olarak değerlendirildi (3).

DNA ekstraksiyonu: PCR tekniği ile doğrulanacak *S. aureus* izolatlarından Brain Heart Infusion Broth'a (Oxoid, CM0225) geçilerek, 37°C'de 18-24 saat süreyle aerob koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, bakteri kültüründen 2 ml eppendorf tüpüne alınarak 10.000 g'de 1 dak. süreyle santrifüj (Biocen 22R) işlemi yapıldı. Daha sonra 180 µl TE buffer ile 7 µl lysesostaphin (Sigma, L7386) ilave edilip, 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı (1). İnkübasyondan sonra DNA ekstraksiyonu için, DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, 69506) üretici firmanın direktiflerine göre kullanılarak, DNA ekstraksiyonları yapıldı ve ekstrakt template DNA olarak kullanıldı.

***S. aureus* izolatlarının PCR tekniği ile doğrulanması:** Yapılan klasik testler sonucu *S. aureus* olarak değerlendirilen izolatlar, standart PCR tekniği kullanılarak doğrulandı. Bu amaçla, öncelikle gradient PCR ile farklı oranlarda MgCl₂ ile PCR koşulları optimize edildi. Daha sonra *S. aureus*'a özgü *nuc* geni ile stafilkoklara özgü *16S rRNA* gen sekansını oluşturan primer çiftleri kullanılarak, amplifikasyon işlemleri yapıldı. Standart PCR işlemi, 25µl hacimde master mix hazırlanarak yapıldı. Bu amaçla, PCR tüplerine 17.7µl ddH₂O, 2.5µl 10xPCR buffer, 1.5µl (25mM) MgCl₂, 0.5 µl (10mM) dNTP mix, 0.2µl Taq DNA polimeraz ve 0.3µl her bir *nuc* ve *16S rRNA* geni primerleri ilave edilip vorteksleildi. Bunu takiben karışımdan, 23µl alınıp içerisinde 2µl template DNA bulunan tüplere aktarılarak, thermocyclerde (Eppendorf, Mastercycler) amplifikasyon işlemi yapıldı (10, 19). Amplifikasyon işlemleri sonrası elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jel elektroforezde 100 volt elektrik akımında 30 dakika yürütülerek elektroforez işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda, pozitif kontrol ve DNA marker yardımıyla elde edilen spesifik DNA bantları UV transilluminatör ve jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenerek değerlendirildi. Çalışmada kullanılan primer sekansları ve amplifikasyon koşulları Tablo 1'de gösterilmiştir.

***S. aureus* izolatlarında enterotoksin genlerinin tespiti:** PCR tekniği ile *S. aureus* olarak doğrulanmış izolatların enterotoksin genleri, Mehrotra ve ark. (20) tarafından önerildiği şekilde, hatalı primer bağlanmalarını

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer sekansları ve amplifikasyon koşulları.
Table 1. List of primers and amplification conditions used in present study.

Gen	Primer Sekansı (5'-3')	(bp)	Amplifikasyon Koşulları	Kaynak
<i>nuc</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	270	94°C'de 4 dak 94°C'de 30 sn 57,5°C'de 30 sn	10
<i>16S rRNA</i>	GTAGGTGGCAAGCGTTATCC CGCACATCAGCGTCAG	228	72°C'de 40 sn (35 siklus) 70°C'de10 dak	21
<i>tst</i>	ATGGCAGCATCAGCTTGATA TTTCCAATAACCACCCGTTT	350		15
<i>sea</i>	GGTTATCAATGTGCGGGTGG CGGCACTTTTTCTCTTCGG	102	94°C'de 4 dk 94°C'de 30 sn	20
<i>seg</i>	AATTATGTGAATGCTCAACCCGATC AAACTTATATGGAACAAAAGGTACTAGTTC	642	64.6°C'de 30 sn,72°C'de 40 sn,(35 siklus) 70°C'de10 dak	14
<i>seb</i>	GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	94°C'de 4dk 94°C'de 30 sn	20
<i>see</i>	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	55°C'de 30 sn 72°C'de 40 sn	20
<i>seh</i>	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG CATCTACCCAAACATTAGCACC	376	(35 siklus) 70°C'de10 dak	14
<i>sei</i>	CTCAAGGTGATATTGGTGTAGG AAAAAACTTACAGGCAGTCCATCTC	577		14
<i>sec</i>	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	451	94°C'de 4 dak 94°C'de 30 sn	20
<i>sej</i>	CATCAGAAGTGTGTTCCGCTAG CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142	55°C'de 30 sn 72°C'de 40 sn	21
<i>sed</i>	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG ATTGGT ATT TTT TTT CGT TC	278	(35 siklus) 70°C'de10 dak	20

önlemek amacıyla 3 ayrı set halinde multiplex PCR tekniği ile yapıldı. Bu amaçla 1. sette *seb*, *see*, *seh* ve *sei* enterotoksin genleri, 2. sette *sec*, *sej* ve *sed* genleri, 3. sette ise *sea* ve *seg* genleri araştırılmış olup, *tst* geni ise ayrı olarak *nuc* ve *16S rRNA* tespitinde olduğu gibi, benzer PCR amplifikasyon koşullarında yapıldı.

Enterotoksin genlerinin tespitinde uygulanan PCR protokolü ve amplifikasyon işlemi: PCR işlemi 30µl hacimde master mix hazırlanarak yapıldı. Bu amaçla, PCR tüplerine 20.7µl ddH₂O, 3µl 10xPCR buffer, 3µl (25mM) MgCl₂, 0.5µl (10mM) dNTP mix, 0.2µl Taq DNA polimeraz ile 0.3µl her bir enterotoksin genine özgü primerler ilave edilip vortekslenildi. Bunu takiben karışımdan 28µl alınarak, içerisinde 2µl template DNA bulunan tüplere aktarılıp, amplifikasyon işlemi yapıldı.

Antibiyotik dirençlilik testleri: İzolatların antibiyotik dirençlilikleri, CLSI (The Clinical and Laboratory Standarts Institute) tarafından bildirilen disk difüzyon yöntemi esas alınarak belirlendi (4). Bu amaçla cefoxitin (30µg), tetracycline (30µg), gentamycin (10µg), oxacillin (1µg), chloramphenicol (30µg), vancomycin (30µg), ampicillin (10µg), sulphamethoxazole-trimethoprim (25µg) ve erythromycin (15µg) antibiyotik disklerikullanıldı.

Referans suşlar: Bu çalışmada referans suş olarak, *S. aureus* (ATCC 25923), *S. aureus* (ATCC 43300) ile Dr. Ömer Akineden'den (Dairy Sciences, Institute of Veterinary Food Sciences, Justus-Liebig University, Gießen-Almanya) temin edilen, farklı enterotoksijenik özellikteki (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tst*) *S. aureus* suşları kullanıldı.

Bulgular

Bu çalışmada analiz edilen sığır karkaslarında, koagülaz-pozitif stafilkoklar örneklerin 32'sinde (%26.6), *S. aureus* ise 15'inde (%12.5) tespit edilmiştir (Tablo 2). Çalışmada test edilen 70 adet koagülaz-pozitif izolatdan 22'si yapılan diğer klasik DNase aktivitesi, β-hemoliz, staphylase test ve anaerob mannitol fermentasyon test sonuçlarına göre *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir. Bu test sonuçlarına göre *S. aureus* olarak değerlendirilen izolatlar, PCR tekniğinde de *S. aureus* olarak doğrulanmıştır (Şekil 1).

S. aureus olarak doğrulanan 22 izolatın enterotoksijenik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan analizlerde, 19'unun (%86,3) farklı tipte enterotoksin genine sahip oldukları saptanmıştır. Bununla ilgili olarak, Şekil 2'de 1. sete (*seb*, *see*, *seh*, *sei*) ait multiplex PCR sonuç-

Tablo 2. Sığır karkas örneklerinde koagülaz-pozitif stafilocok ve *S. aureus*'un varlığı.

Table 2. Occurrence of coagulase-positive staphylococci and *S. aureus* on beef carcass samples.

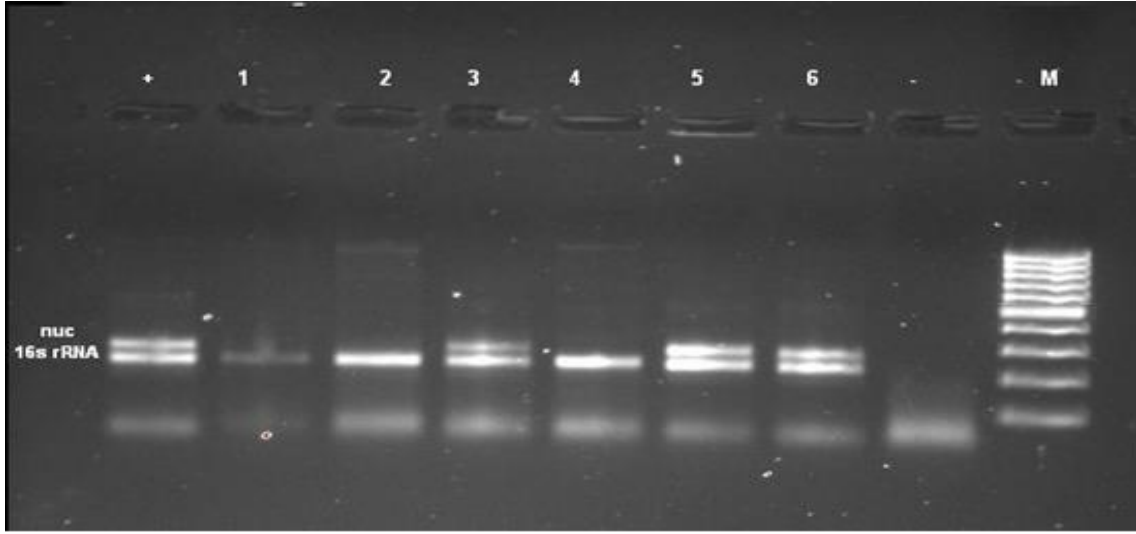
Örnek	Koagülaz-pozitif stafilocok	<i>S. aureus</i>
	Pozitif örnek sayısı/Toplam örnek sayısı (%)	Pozitif örnek sayısı/Toplam örnek sayısı (%)
Sığır karkas	32/120 (26,6)	15/120 (12,5)

Tablo 3. *S. aureus* izolatlarının enterotoksijenik özellikleri.

Table 3. Enterotoxigenic properties of *S. aureus* isolates.

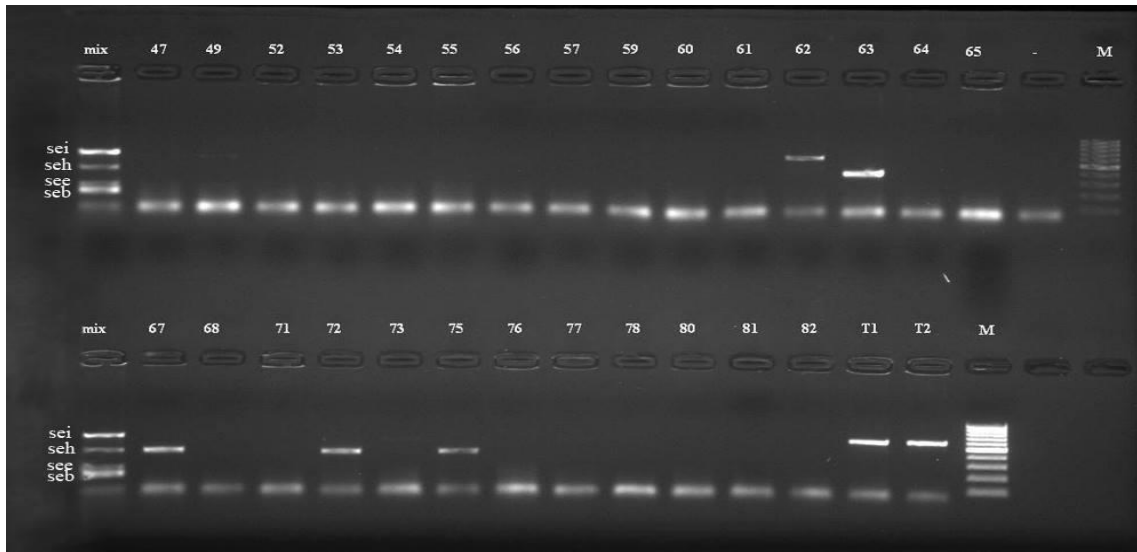
Enterotoksin geni	İzolat Sayısı (%)
<i>seh</i>	8 (%36,3)
<i>sea</i>	5 (%22,7)
<i>sei</i>	1 (%4,5)
<i>seg+sei</i>	2 (%9)
<i>sed+sej</i>	1 (%4,5)
<i>sea+tst</i>	1 (%4,5)
<i>tst</i>	1 (%4,5)
-	3 (%13,6)

n=22



Şekil 1. *S. aureus*'un *nuc* (270 bp) ve *16S rRNA* (228 bp) genlerine göre multipleks PCR görüntüsü. (M:marker, +: Pozitif kontrol, 1-2-4: *S. aureus* negatif, 3-5-6: *S. aureus* pozitif.

Figure 1. Multiplex PCR image of *S. aureus* isolates that confirmed with *nuc* (270 bp) and *16S rRNA* (228 bp) genes. (M: marker, +: Positive control, 1-2-4: *S. aureus* negative, 3-5-6: *S. aureus* positive.



Şekil 2. Enterotoksin genlerinin multipleks PCR görüntüsü: (M: marker, mix: pozitif kontrollörler, 62-T1-T2: *sei* pozitif, 63-67-72-75: *seh* pozitif). *seb* (164 bp) / *see* (209 bp) / *seh* (376 bp) / *sei* (577 bp).

Figure 2. Multiplex PCR image of *S. aureus* enterotoxigenic genes: (M: marker, mix: positive controls, 62-T1-T2: *sei* positive, 63-67-72-75: *seh* positive). *seb* (164 bp) / *see* (209 bp) / *seh* (376 bp) / *sei* (577 bp).

ları gösterilmiştir. Farklı tipte enterotoksin genine sahip olan bu 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 oldukları belirlenmiştir (Tablo3).

Aynı şekilde, yapılan antibiyotik dirençliliği testleri sonucunda *S. aureus* izolatlarından %72,7'sinin (16/22) ampisiline, %54,5'inin (12/22) tetrasikline, %40,9'unun (9/22) eritromisine ve %22,7'sinin (5/22) sülfametaksazol-trimetoprim yüksek oranda dirençli olduğu, vankomisine ise tümünün duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Buna ilaveten izolatların tamamı vankomisin hariç en az 1 antibiyotiğe, 16 izolat en az 2, 9 izolat en az 3, 6 izolat en az 4 farklı antibiyotiğe dirençli ya da orta düzeyde dirençli olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. *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)	2 (%9,0)	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

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, toplam 120 sığır karkasının 15'inde (%12.5) *S. aureus* saptanmıştır. Değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda (12, 17, 22, 26, 27) değişik hayvan türlerine ait etlerde *S. aureus* düzeyinin farklı seviyelerde bulunduğu rapor edilmiştir. Lim ve ark. (17) tarafından Kore'de yapılan bir çalışmada, mezbaha ve marketlerden alınan toplam 890 adet sığır eti örneğinin 86'sının %9.7 düzeyinde *S. aureus* ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde Normanno ve ark. (23) tarafından yapılan çalışmada, 993 adet et ürünü örneğinin %10'ununda *S. aureus* tespit edilmiştir. Araştırmacıların bulguları ile bu çalışmanın sonuçları uyum göstermektedir.

Hanson ve ark. (12) 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* düzeyi sırasıyla %18.2, 17.8, 6.9 ve 19.4 düzeyinde

saptanmıştır. Pu ve ark. (27) ise 90'nı domuz, 30'u sığır eti olmak üzere toplam 120 örnekte yaptığı çalışmada domuz etlerinin 41'inde (%45.6), sığır etlerinin ise 6'sında (%0) *S. aureus* saptamışlardır. Benzer şekilde, Pesavento ve ark. (26) tarafından yapılan çalışmada 176 adet et örneğinden (sığır, kanatlı, domuz) 42'sinin (%23.8) *S. aureus* yönünden pozitif bulunduğu bildirilmiştir. Bhargava ve ark. (9) ise ABD'nde yaptıkları çalışmada, 289 çiğ et örneğinden (sığır, piliç, hindi) 65'inin (%22.5) *S. aureus* yönünden pozitif olduğunu saptamışlardır. Jackson ve ark. da (13) 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. Aynı şekilde Van Loo ve ark. (30) 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. (12) dışında, diğer araştırmacıların değişik hayvan türlerine ait etlerde *S. aureus*'un varlığına ilişkin sonuçları, bu çalışmadaki *S. aureus*'a ait veriden (%12.5) yüksektir. Sonuçlar arasındaki farklılığın muhtemelen başta örneklerin farklı oluşu ile örnekleme zamanları ve hijyenik koşulların farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Yılmaz ve Gümüş (32) yaptıkları çalışmada, mezbaha ve kasaplardan alınan 300 karkas örneği içerisinde mezbahadan alınan örneklerde *S. aureus*'un %30, kasaplardan alınan örneklerde ise %80 düzeyinde bulunduğunu bildirmiş olup, kasaplardan alınan örneklerde oranın yüksek oluşunu nakil sırasındaki ve kasaplardaki hijyen eksikliğinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, izole edilen enterotoksijenik stafilkoklardan 8'i (%36,3) *seh*, 2'si (%9) *seg+sei*, 1'i (%4,5) *sei* ve 1'ide (%4.5) *tst* tipi olarak bilinen, yeni tanımlanan enterotoksin genlerine sahip oldukları saptanmıştır. Klasik enterotoksinlerden (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) ise izolatlarda düşük düzeyde *sea* ve *sed* tipi enterotoksin geni belirlenmiştir. Aydın ve ark. (6) tarafından yapılan çalışmada da, enterotoksijenik stafilkok izolatlarının (%53.3) yeni tanımlanan (*seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*, ve *seu*) toksin genlerine, klasik toksinlerden daha fazla oranda sahip oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, Arcuri ve ark. da (5) çalışmalarında 291 adet *S. aureus* izolatından 109'unun en az bir enterotoksin genine sahip olup, bunlardan 87'sinin yeni tanımlanan enterotoksin genleri olduklarını rapor etmişlerdir. Yine Bania ve ark. (7) tarafından yapılan çalışmada, çeşitli et ve et ürünlerinden izole edilen enterotoksijenik 27 izolatın 9'unun klasik enterotoksin genlerine, 18'inin ise yeni tanımlanan enterotoksin genlerine sahip oldukları saptanmıştır. Aynı şekilde Pereira ve ark. (25) tarafından yapılan çalışmada, değişik gıdalardan izole edilen 148 adet koagülaz-pozitif stafilkok 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. Rosec ve Gigaud'da (28) değişik gıdalardan izole ettikleri 332 *S. aureus* izolatının PCR tekniği ile yapılan analizlerinde %57'sinin hem klasik enterotoksin genlerini hem de yeni tanımlanan enterotoksin genlerini içerdiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarında, özellikle yeni tanımlanan enterotoksin genlerini daha fazla sayıda saptamış olmaları ile bu çalışmanın bulguları arasında benzerlik bulunmaktadır. Ancak, Normanno ve ark. (23) çalışmalarında izole edilen 125 adet 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 belirtmiş olup, araştırmacıların sonuçlarıyla bu çalışmaların sonuçları arasında farklılık mevcuttur. Bu farklılığın muhtemelen başta örnek tipleri olmak üzere, kontaminasyon kaynakları ile metodolojik farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

S. aureus izolatlarının antibiyotik dirençliliği ile ilişkili çalışmalarda, izolatların farklı antibiyotiklere karşı farklı düzeyde dirençli oldukları bildirilmiştir. Bu bağlamda Hanson ve ark. (12) 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. (23) 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 bildirilmiştir. Pesavento ve ark. (26) sığır, domuz ve kanatlı eti orijinli 42 adet *S. aureus* suşundan, 28'inin test edilen 12 değişik antibiyotikten en az birine dirençli bulunduğunu belirtmişlerdir. Türkiye'de benzer konuda Gündoğan ve ark. (11) 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. Araştırmacılar, antibiyotik dirençliliğinin insanlara taşınmasında gıdaların önemli bir araç olabileceğini belirtmiş olup, bununda gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntıları ve dirençli gıda patojenlerinin transferi ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çerçeveden bakıldığında, antibiyotik dirençliliği ile ilişkili çalışma sonuçları arasında farklılıkların bulunması mümkün gözükmemekte olup, uyumsuzluğun muhtemelen coğrafi farklılıklar başta olmak üzere, hayvan türleri, tedavi amaçlı antibiyotik kullanım tercihleri ve sıklığı ile gıda güvenliğine ilişkin yasal mevzuatlar gibi birçok faktörün farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, sığır karkaslarından izole edilen *S.*

aureus izolatlarının %86.3'ü enterotoksijenik özellikle saptanmış olup, ayrıca izolatların çoğu bir ve/veya birden fazla antibiyotiğe karşı da dirençli bulunmuştur. Bu nedenle sağlıklı sığır eti üretimi ve halk sağlığının korunması için mezbahalarda etkin HACCP sisteminin uygulanması gereklidir.

Kaynaklar

1. **Akineden Ö, Hassan AA, Schneider E ve ark.** (2008): *Enterotoxigenic properties of Staphylococcus aureus isolated from goats' milk cheese*. Int J Food Microbiol, **124**, 211-216.
2. **Anon** (1996): *USDA/FSIS (United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service)*. Federal Register, **61**, 38931-38937.
3. **Anon** (2003): *ISO (International Standard Office, 6888-1)*. *Microbiology of food and animal feedingstuffs-horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (S. aureus and other species)*.
4. **Anon** (2011): *CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute)*. *The Clinical and Laboratory Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 21th Informational Supplement. M100-S21. Wayne Pa.
5. **Arcuri EF, Angelo FF, Guimarães MF ve ark.** (2010): *Toxigenic status of Staphylococcus aureus isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil*. J Food Prot, **73**, 2225-2231.
6. **Aydın A, Sudagıdan M, Muratoğlu 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.
7. **Bania J, Dabrowska A, Bystron J ve ark.** (2006): *Distribution of newly described enterotoxin like genes in Staphylococcus aureus from food*. Int J Food Microbiol, **108**, 36-41.
8. **Bergdoll MS, Lee Wong AC** (2006): *Staphylococcal intoxications*. 523-562. In: HP Rieman, DO Cliver (Eds), *Foodborne Infections and Intoxications*, Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, California.
9. **Bhargava K, Wang X, Donabedian ve ark.** (2011): *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in retail meat, Detroit, MI, USA*. Emerg Infect Dis, **17**, 1135-1137.
10. **Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland J A** (1992): *Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene*. J Clin Microbiol, **30**, 1654-1660.
11. **Gündoğan N, Çıtak S, Yücel N ve ark.** (2005): *A note on the incidence and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from meat and chicken samples*. Meat Sci, **69**, 807-810.
12. **Hanson BM, Dressler AE, Harper AL ve ark.** (2011): *Prevalence of Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) on retail meat in Iowa*. J Infect Public Health, **4**, 169-174.
13. **Jackson CR, Davis JA, Barrett JB** (2013): *Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from retail meat and humans in Georgia*. J Clin Microbiol, **51**, 1199-1207.

14. **Jarraud S, Cozon G, Vandenesch FBM ve ark.** (1999): *Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever.* J Clin Microbiol, **37**, 2446–49.
15. **Johnson WM, Tyler SD, Ewan, EP ve ark.** (1991): *Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin I in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol, **29**, 426–430.
16. **Kitai S, Shimizu A, Kawano J, ve ark.** (2005): *Characterization of methicillin-resistant S. aureus isolated from retail raw chicken meat in Japan.* J Vet Med Sci, **67**, 107-110.
17. **Lim SK, Nam HM, Park HJ ve ark.** (2010): *Prevalence and characterization of methicillin resistant Staphylococcus aureus in raw meat in Korea.* J Microbiol Biotech, **20**, 775–778.
18. **Lowy, F. D** (1998): *Staphylococcus aureus infections.* The New England J Med. **339**, 520-532.
19. **Maes N, Magdalena J, Rottiers S ve ark.** (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.
20. **Mehrotra M, Wang G, Johnson WM** (2000): *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin I and methicillin resistance.* J Clin Microbiol, **38**, 1032-1035.
21. **Monday SR, Bohach GA** (1999): *Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates.* J Clin Microbiol, **37**, 3411-3414.
22. **Nitzsche S, Zweifel C, Stephan R** (2007): *Phenotypic and genotypic traits of Staphylococcus aureus strains isolated from pig carcasses.* Vet Microbiol, **120**, 292–299.
23. **Normanno G, Corrente M, La Salandra G ve ark.** (2007): *Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products.* Int J Food Microbiol, **115**, 290-296.
24. **Pelisser MR, Klein CS, Ascoli KR ve ark.** (2009): *Occurrence of Staphylococcus aureus and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products.* Braz J Microbiol, **40**, 145–148.
25. **Pereira V, Lopes C, Castro A ve ark.** (2009): *Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of staphylococcus aureus isolates from various foods in portugal.* Food Microbiol, **26**, 278-282.
26. **Pesaento G, Duccib B, Comodo N ve ark.** (2007): *Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolated from raw meat: A research for methicilin resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Food Control, **18**, 196-200.
27. **Pu S, Han F, Ge B** (2009): *Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Louisiana retail meats.* Appl Environ Microbiol, **75**, 265-267.
28. **Rosec JP, Gigaud O.** (2002): *Staphylococcal enterotoxin genes of classical and New types detected by PCR in France.* Int J Food Microbiol, **77**, 61-70.
29. **Schneewind O, Missiakas D** (2009): *Staphylococcus aureus and related Staphylococci.* 275-294. In: E Goldman, LH Green (Eds), Practical Handbook of Microbiology. CRC Press, USA.
30. **Van Loo IHM, Diederer BMW, Savelkoul PHM ve ark.** (2007): *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus in meat products, the Netherlands.* Emerg Infect Dis, **13**, 1753-1755.
31. **Witte, W, Cuny, C, Strommenger B, ve ark.** (2004): *Emergence of community-acquired MRSA in Germany.* Eurosurveillance, **9**, 16-18.
32. **Yılmaz İ, Gümüş T** (2004): *Sığır karkaslarının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi.* Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs. Erzurum.
33. **Zhang S, Iandolo J.J, Stewart GC** (1998): *The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin in determinant (sej).* FEMS Microbiol Lett, **168**, 227–233.

Geliş tarihi: 08.01.2014/ Kabul tarihi: 26.02.2015

Yazışma adresi:

Yrd. Doç. Dr. Erhan Keyvan
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi
Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı,
Burdur.
e-mail: erhankeyvan@mehmetakif.edu.tr