



## Çeşitli Hayvan Türlerine Ait Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Stafilokokal Enterotoksinlerin Varlığının Araştırılması

Candan GÜNGÖR<sup>1,a</sup>, Dursun Alp GÜNDOĞ<sup>1,b</sup>, Yasin ÖZKAYA<sup>1,c</sup>, Nurhan ERTAŞ ONMAZ<sup>1,d</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE  
ORCID: <sup>a</sup>0000-0002-4321-2770; <sup>b</sup>0000-0002-1581-1813; <sup>c</sup>0000-0002-4746-5492; <sup>d</sup>0000-0002-4679-6548

**Sorumlu yazar:** Dursun Alp GÜNDOĞ; E-posta: gundog.alp@gmail.com

**Atıf yapmak için:** Güngör C, Gündoğ DA, Özkaya Y, Onmaz NE. Çeşitli hayvan türlerine ait çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve stafilokokal enterotoksinlerin varlığının araştırılması. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2024; 21(2):86-91

**Öz:** *Staphylococcus aureus* ve Stafilokokal Enterotoksinler (SE), hastane ve toplum kaynaklı hastalıklarla ilişkili ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle süt hayvanlarından çiğ süte geçen *S. aureus*, insanlarda gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır. Bu çalışmada, Kayseri bölgesinde satışa sunulan 500 çiğ süt örneğindeki (inek sütü=200; koyun sütü=200; manda sütü= 100) *S. aureus* ve SE'lerin prevalans ve çeşitliliği PCR ve ELISA yöntemleri ile araştırıldı. Analiz edilen süt örneklerinin 380'inden (%76) koagülaz pozitif *S. aureus* (KPS) izole edildi. PCR testi ile KPS izolatlarının 136'sı (% 35.7) *S. aureus* olarak tanımlandı. Bu izolatların 52'si koyun, 48'i inek ve 36'sı manda sütlerine ait idi. Belirlenen 136 izolatın m-PCR metodu ile incelenmesi sonucunda, 16 izolatın SE genlerinden en az birini içerdiği gözlemlendi. Bu genlerin 6'sının *sea*, 1'inin *seb*, 4'ünün *sec* ve 5'inin *sed* geni olduğu belirlendi. ELISA testi sonucu, çiğ sütlerdeki enterotoksin dağılımları ise; *SEA*: 2 inek, 1 koyun ve 1 manda; *SEC*: 2 manda ve 1 inek; *SED*: 1 inek ve 2 koyun şeklinde idi. Sonuç olarak bu çalışma, Kayseri bölgesinde satışa sunulan çiğ sütlerde *S. aureus* ve SE'lerin varlığını ortaya koyarak, sütte gıda güvenliği ve halk sağlığı için iyi üretim uygulamaları (Good manufacturing practices; GMP), personel hijyeni ve eğitimi, çiftlik ve ekipmanların sanitasyonu, meme hijyeni ve sağlığı ve tehlike analizleri ve kritik kontrol noktaları (Hazard Analysis and Critical Control Points; HACCP) uygulamaları ile kontaminasyon riskinin azaltılmasının önemini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Çiğ süt, halk sağlığı, *S. aureus*, stafilokokal enterotoksinler

### Investigation of the Presence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Milk of Various Animal Species

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins (SE) are a serious public health issue associated with hospital- and community-acquired diseases. *S. aureus*, especially transmitted from dairy animals to raw milk, causes food poisoning in humans. In this study, the prevalence and disruption of *S. aureus* and SEs in 500 raw milk samples (cow milk= 200; sheep milk= 200; buffalo milk= 100), offered for sale in the Kayseri region, were investigated by PCR and ELISA methods. Coagulase positive *S. aureus* (CoPS) was isolated from 380 (76%) of the analysed milk samples. According to the PCR test, 136 (35.7%) of the CoPS isolates were identified as *S. aureus*, 52 of these isolates belonged to sheep, 48 to cow and 36 to buffalo milk. Among the 136 isolates, 16 of them found to contain at least one of the SE genes with the m-PCR method. It was determined that 6 of these genes were *sea*, 1 was *seb*, 4 was *sec* and 5 was *sed*. According to the ELISA test, enterotoxin distributions in raw milks are *SEA*: 2 cow's, 1 sheep and 1 buffalo; *SEC*: 2 buffalo's and 1 cow; *SED*: 1 cow and 2 sheep. As a result, this study revealed the presence of *S. aureus* and SEs in raw milk sold in the Kayseri region and shows the importance of reducing the risk of contamination through good manufacturing practices (GMP), personnel hygiene and training, sanitation of farms and equipment, under hygiene and health and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) applications for food safety and public health in milk.

**Key words:** Public health, raw milk, *S. aureus*, staphylococcal enterotoxins

### Giriş

Gıdalar, patojen zoonoz mikroorganizmaların taşınmasında bilinen en önemli kaynaklardır. Bu patojenlerin yol açtığı gıda kaynaklı enfeksiyonlar, önemli bir halk sağlığı riski oluşturarak her yıl global ölçekte önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Garcia ve ark., 2020). İnsan diyetinde önemli bir yeri olan

süt, zengin besin içeriği ve nötral pH'sı sebebiyle faydalı ve patojen mikroorganizmaların üremesi ve taşınmasında önemli bir gıdadır (Sudhanthiramani ve ark., 2015). Bu bağlamda çiğ sütler, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp. ve *Salmonella* spp., gibi patojenleri ve bakteriyel toksinleri taşıyarak gıda kaynaklı hastalıklara sebep olmaktadır (Dhanashekar ve ark., 2012). Bu patojenlerin arasında, sağlıklı insan ve hayvanların mukoza ve deri florasında bulunan gram-pozitif *Staphylococcus aureus*,

salgıladıkları Stafilocokkal Enterotoksinler (SE) ile dünya genelinde gıda kaynaklı gastroenteritisin ana sebeplerinden biri olarak kabul edilmektedir (Oliveira ve ark., 2018). Stafilocokkal gıda zehirlenmelerinden sıklıkla insan kaynaklı *S. aureus* suşları sorumlu tutulsa da çiğ süt, çiğ süt peynirleri, çiğ veya pişmiş et gibi hayvansal orijinli suşlar da enterotoksijenik *S. aureus*'lar için önemli bir kaynak olarak kabul edilmektedir (Zhang ve ark., 2022). Gıdaların toplanma, işleme, taşınma, depolama, pişirme veya servis ve muhafaza aşamalarında *Staphylococcus* türleri ile kontamine olması veya toksin üretmelerini destekleyecek ortamların oluşması Stafilocokkal gıda zehirlenmelerine yol açmaktadır (Hennekinne ve ark., 2012). Bu toksinler arasında klasik SE'ler olarak kabul edilen *SEA*, *SEB*, *SEC*, *SED* ve *SEE*, et ve süt ürünleri gibi protein açısından zengin gıdalarda, uygun üreme koşullarında (10-46°C ve pH 5-9), enterotoksijenik *S. aureus* suşlarının yüksek yoğunluklarda çoğalmasından sonra üretilir (Sankomkai ve ark., 2020). Bunlar arasında, gıda zehirlenmeleri olgularında en çok *SEA* enterotoksini görülmekle birlikte bunu sırasıyla *SED* ve *SEB* izlemektedir (Liu ve ark., 2022). SE proteinleri, ısı, dondurma, kurutma ve düşük pH gibi kriterlere yüksek direnç göstermekte ve gastrointestinal sistemde bulunan proteaz etkili enzimlere karşı kolayca hidrolize olmamaları onları gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemli bir risk haline getirmektedir (Hennekinne ve ark., 2012; Liu ve ark., 2022). SE'lerin tüketiminden sonra, gastrointestinal konjesyon ve ödem, elektrolit metabolizma bozuklukları, ishal, abdominal ağrı, vagus sinirinin uyarımıyla kusma gibi semptomlar gözlenirken, daha şiddetli vakalarda tüm vücut doku ve organlarında purulent enfeksiyon, pnömoni, sepsis ve toksik şok sendromu şekillenebilmektedir (Hennekinne ve ark., 2012). SE'lerin minimum enfektif dozu 1 µg'dır ve gıdalardaki *S. aureus* sayısı 10<sup>5</sup> cfu/ml veya g'nin üzerinde olduğunda görünür hale gelmektedir. Ancak 100-200 ng SE'nin alınması duyarlı hastalarda Stafilocokkal gıda zehirlenmesine neden olabilmektedir (Ahmed ve ark., 2019). Gıdalardaki SE varlığının tespitinde, immunoassay, immunodifüzyon, radyoimmün, lateks aglütinasyon ve çift jel difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır (Féraudet Tarrisse ve ark., 2021). Enterotoksin genlerinin varlığı ise Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR) yöntemi veya İlimiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) yöntemleri ile tespit edilmektedir (Goto ve ark., 2007; Yin ve ark., 2016). Bu çalışmada, Kayseri bölgesindeki farklı hayvan türlerine ait çiğ sütlerde enterotoksijenik *S. aureus* varlığının araştırılması, çiğ sütlerin klasik SE ile kontaminasyon durumlarının belirlenmesi ve elde edilen izolatlarda SE genlerin tespit edilmesi ve dolayısıyla çiğ sütün halk sağlığı açısından güvenilirliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

### Süt örnekleri

Çalışma kapsamında, Mart 2015- Ağustos 2016 tarihleri arasında Kayseri ilinde satışa sunulan farklı hayvan türlerine ait toplam 500 adet çiğ süt (200 koyun sütü, 100 manda sütü ve 200 inek sütü) toplandı. Süt örnekleri steril poşetler içerisine her biri 500 mL olacak şekilde aseptik şartlarda alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi ve 1-2 saat içinde *S. aureus* varlığı açısından analiz edildi.

### Süt örneklerinde *S. aureus* izolasyonu

Süt örneklerinden *S. aureus* izolasyonu daha önce ISO 6888-1 standart prosedüründe (ISO, 1999) tanımlandığı gibi gerçekleştirildi. Kısaca her bir süt örneğinin 25 mL'si 225 mL steril tamponlanmış peptonlu su ile (Oxoid CM0509) ile homojenize edildikten sonra on kat seri (10<sup>-1</sup>-10<sup>-4</sup>) dilüsyonları hazırlandı. Her bir dilüsyon %5 yumurta sarısı ve tellürit (Merck, Almanya) içeren Braid-Parker Agar Besiyeri (BPM; Oxoid, İngiltere) üzerine yayma plak yöntemi ile ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında, gri ve siyah renkli berrak bölgeyle çevrelenmiş karakteristik koloniler stafilocok şüpheli olarak değerlendirildi. BPM'de üreyen şüpheli kolonilerden beşi seçilerek kanlı agara (Merck,Almanya) pasajlandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kanlı agarda büyüyen koloniler Gram boyama, koagülaz, katalaz ve oksidaz testlerine tabii tutuldu. Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve koagülaz pozitif olan koloniler PCR ile test edildi.

### DNA ekstraksiyonu

Fenotipik testler ile tespit edilen koagülaz pozitif Stafilocok izolatlarının (KPS) genomik DNA'sı (gDNA), izolatların Brain Heart Infusion Broth'ta (Merck, Almanya) 37°C'de 18 saat boyunca inkübasyonu sonucu elde edilen taze kültürlerinden InstaGene™ Matrix kiti (BIO-RAD, ABD) kullanılarak üretici firma talimatlarına göre ekstrakte edildi.

### İzolatlarda *nuc* geninin belirlenmesi

Çalışma kapsamında süt örneklerinden elde edilen KPS pozitif izolatlarının DNA'sı, *S. aureus* 'un ısıya dirençli nükleaz genini kodlayan *nuc*(A) geninin belirlenmesi amacı ile Tablo 1'de belirtilen spesifik primerler kullanılarak PCR analizine tabii tutuldu. PCR reaksiyon karışımı toplam hacmi 50 µL olacak şekilde; 1 x PCR tamponu (Thermo, ABD), 200 µM dNTP karışımı (Thermo, ABD), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo, ABD), 2 U Taq polimeraz, 30 pmol her bir primer çifti (NUC-F166 ve NUC-R565) ve 5 µL şablon DNA'dan oluştu. PCR koşulları: 94°C 5 dk İlk denatürasyonu takiben, 30 siklattan oluşan 94°C'de 1 dk denatürasyon, 56°C'de 1 dk primer bağlanması, 68°C'de 1 dk uzama ve daha sonra tek siklattan oluşan 72°C'de 7dk son

uzama aşamalarında gerçekleştirildi (Cremonesi ve ark., 2005).

### **S. aureus pozitif izolatlarda klasik S. aureus enterotoksin genlerinin belirlenmesi**

İzolatlarda klasik SE genlerinin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) varlığı Ertaş ve ark. (2010) tarafından kullanılan metoda göre multipleks PCR (m-PCR) ile belirlendi. Kısaca, PCR reaksiyon karışımı, 2.5 uL şablon DNA, 1 x PCR tamponu, 1 U Taq polimeraz (Vivantis), 0.2 uM dNTP Karışımları (Vivantis), 4 mM MgCl<sub>2</sub> (Vivantis) ve Tablo 1'de belirtilen analiz edilen toksinler için spesifik primerlerin (SA-U, SA-A, SA-B, SA-C/ENT-C, SA-D) her birinden 25 pmol olacak şekilde total 25 µL hacimde hazırlandı. PCR amplifikasyonu, 5 dakika boyunca 94°C'lik bir başlangıç denatürasyonunun ardından, 94 °C'de 30 sn, 50°C 'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn'den oluşan 35 siklus ve 72 °C'de 2 dk. tek siklustan oluşan son uzatma aşamalarından oluştu.

roplakalar 37°C'de bir saat inkübe edildikten sonra otomatik yıkayıcıda yıkama solüsyonu kullanılarak 6 kez yıkandı. Sonrasında her bir kuyucuğa 100'er µL konjugat 1 ilave edilerek 37 °C'de 1 saat inkübasyonu takiben kuyucuklar 6 kez yıkandı. Ardından kuyucuklara 100'er µL konjugat 2 eklendi ve 30 dk bekletildikten sonra tekrar 6 defa yıkama işlemi yapıldı. Bu işlemden sonra kuyucuklara 50'şer µL substrat/kromojen ilave edildi ve nazik bir şekilde karıştırılarak 37°C'de karanlık ortamda 15 dk inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu ilave edilerek ELISA otomatik okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan Spectrum, ABD) 450 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları okutuldu. ELISA testi sonuçları Rida® Soft Win programı kullanılarak değerlendirildi.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan primer dizilimleri ve baz büyüklükleri

Hedef gen	Primer adı	Primer dizilimi (5'-3')	Baz büyüklüğü (bp)
<i>nuc</i>	nuc-F	AGTTCAGCAAATGCATCACA	400
	nuc-R	TAGCCAAGCCTTGACGAACT	
-	SA-U	TGTATGTATGGAGGTGTAAC	-
<i>sea</i>	SA-A	ATTAACCGAAGGTTCTGT	270
<i>seb</i>	SA-B	ATAGTGACGAGTTAGGTA	165
<i>sec</i>	ENT-C	AATTGTGTTTCTTTTATTTTCATAA	102
<i>sed</i>	SA-D	TTCGGGAAAATCACCCCTTAA	306
<i>see</i>	SA-E	GCCAAAGCTGTCTGAG	213

### **Süt örneklerinde klasik S. aureus ve SE'lerin varlığının ELISA testi ile belirlenmesi**

Çalışma kapsamında toplanan süt örneklerinde *S. aureus* enterotoksinlerinin (SET A, B, C, D, E) varlığı ticari bir kit (Ridascreen® SET A, B, C, D, E, r-biopharm, Almanya) kullanılarak üretici firma talimatlarına göre Enzim-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) metodu ile test edildi. Kısaca, çiğ süt örnek-

### **Bulgular**

Analiz edilen süt örneklerinin 380 (%76)'i KPS pozitif olarak belirlendi, KPS izolatlarınının 130 (%34.2)'u inek sütünden, 160 (%42.1)'i koyun sütünden ve 90 (%23.6)'i manda sütünden izole edildi. Süt örneklerindeki KPS sayıları 1x10<sup>2</sup>-6.2x10<sup>8</sup> kob/mL arasında idi. İzole edilen KPS izolatlarının örneklerle göre dağılımı ve sayıları Tablo 2'de belirtilmiştir.

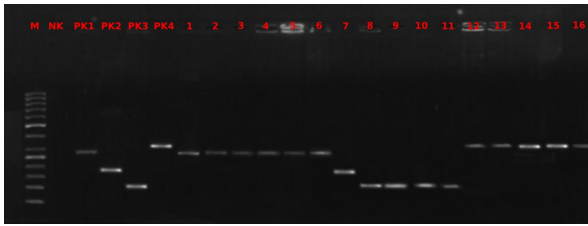
**Tablo 2.** Çalışmada izole edilen Koagülaz Pozitif Stafilocokların örneklerle göre dağılımı

Analiz edilen süt örnekleri	Analiz edilen örnek sayısı	İzole edilen KPS sayısı (%)	Örneklerdeki KPS sayısı (kob/mL)		
			≤10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup> -1x10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>5</sup>
<b>İnek sütü</b>	200	130 (65)	40 (30.8)	60 (46.2)	30 (23.1)
<b>Koyun sütü</b>	200	160 (80)	75 (46.9)	65 (40.6)	20 (12.5)
<b>Manda Sütü</b>	100	90 (90)	35 (38.9)	38 (42.2)	17 (18.9)
<b>Toplam</b>	500	380 (76)	150 (38.5)	163 (42.9)	67 (17.6)

leri soğutmalı santrifüjde 3500 g'de 10°C'de, 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra üstteki krema tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra süt örnekleri distile su ile 1:20 oranında sulandırıldıktan sonra filtre edildi. Elde edilen filtratın 100 µL'si ELISA testinde kullanıldı. ELISA testi için, kit içerisinde bulunan mikropalakadaki A'dan G'ye kadar olan kuyucuklara 100'er µL çiğ süt örneklerinden elde edilen filtrat, H kuyucuğuna ise 100 µL pozitif kontrol ilave edildi. Daha sonra mik-

Elde edilen KPS izolatlarınının 136'sında (%35.7) *nuc* geni tespit edildi ve *S. aureus* olarak identifiye edildi. Bu izolatların 52 (%38.2)'si koyun sütünden, 48 (%35.2)'i inek sütünden ve 36 (%26.4)'sı manda sütüne aitti. Örnek bazında değerlendirildiğinde; koyun inek ve manda sütlerinin sırasıyla %26, %24 ve %36'sının *S. aureus* ile kontamine olduğu saptandı.

*S. aureus* pozitif izolatların 10 (%7.3)'ünde enterotoksin (SE) sentezleme yeteneği belirlendi. Bu SE'lerin 4 (%2.9)'ü *SEA*, 3 (%2.2)'ü *SEC* ve 3 (%2.2)'ü *SED* idi. Tip A enterotoksin 2 inek (%4.1), 1 (%1.9) koyun ve 1 (%2.7) manda sütünde, *SEC*; 2 (%5.5) manda ve 1 (%2) inek sütünde, *SED* ise 1 (%2) inek sütü, 2 (%3.8) koyun sütünde belirlendi. mPCR sonuçları ise analiz edilen 136 *S. aureus* izolatının 16 (%11.7)'sinin SE geninden en az birini taşıdığını gösterdi. Bu izolatların, 6 (%37.5)'si *sea*, 1 (%6.25)'i *seb*, 4 (%25)'ü *sec* ve 5 (%31.25)'i *sed* geni içeriyordu (Şekil 1).



**Şekil 1.** M: Merdiven (50-1000 bp), NK: Negatif Kontrol (Distile Su), PK1: Pozitif kontrol (Enterotoksin A: ATCC 29231), PK2: Pozitif Kontrol (Enterotoksin B: NCTC 10654), PK3: Pozitif Kontrol (Enterotoksin C: NCTC 10655), PK4: Pozitif kontrol (Enterotoksin D: NCTC 10652), 1-6: *S. aureus* enterotoksin A (270 bp), 7: *S. aureus* enterotoksin B (165 bp), 8-11: *S. aureus* enterotoksin C (102 bp), 12-16: *S. aureus* enterotoksin D (306 bp).

Analiz edilen inek, koyun ve manda sütüne ait izolatların sırasıyla 3 (%6.2)'ü, 2 (%3.8)'si ve 1 (%2.7)'i *sea* geni taşıyordu. *seb* geni 1 (%2) inek izolatlarında, *sec* geni; 2 (%5.5) manda, 1 (%2) inek ve bir (%1.9) koyun sütünde, *sed* geni ise 2 (%4) inek sütü, 2 (%3.8) koyun sütü ve 1 (%2.7) manda sütünde saptandı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Stafilokokal enterotoksinlerin ve enterotoksin genlerinin analiz edilen izolatlara göre dağılımı

Örnekler	<i>S. aureus</i> pozitif örnek sayısı (%)	SE belirlenen Örnek sayısı (%)				SE genlerinin Dağılımı (%)			
		<i>SEA</i>	<i>SEB</i>	<i>SEC</i>	<i>SED</i>	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>
İnek sütü (n=200)	48 (24)	2 (4.1)	ND	1 (2)	1 (2)	3 (6.2)	1 (2)	1 (2)	2 (4)
Koyun sütü (n=200)	52 (26)	1 (1.9)	ND	ND	2 (3.8)	2 (3.8)	-	1 (1.9)	2 (3.8)
Manda Sütü (n=100)	36 (36)	1 (2.7)	ND	2 (5.5)	ND	1 (2.7)	-	2 (5.5)	1 (2.7)
<b>Toplam (n=500)</b>	<b>136 (27.2)</b>	<b>4 (2.9)</b>	<b>ND</b>	<b>3 (2.2)</b>	<b>3 (2.2)</b>	<b>6 (16.6)</b>	<b>1 (0.7)</b>	<b>4 (2.9)</b>	<b>5 (3.6)</b>

ND: Belirlenemedi

## Tartışma ve Sonuç

Süt insan ve yeni doğan hayvanlar için önemli bir besin kaynağı olmakla birlikte aynı zamanda mikroorganizmaların büyümesi ve çoğalması içinde uygun bir ortamdır (Sudhanthiramani ve ark., 2015). Uygun koşullarda üretilmeyen ve pastörize edilmeyen sütün tüketilmesi sonucu oluşabilecek sağlık problemlerine rağmen, doğal işlenmemiş gıdalara artan yönelim, çiğ süte olan talebi de arttırmıştır (Yıbar ve Küçük, 2019). Süt ve süt ürünleri üzerine yapılan çalışmalarda, Stafilokokların çiğ sütte bulunan yaygın fırsatçı patojenler olduğu ve ürettikleri enterotoksinler nedeni ile önemli gıda zehirlenmelerine neden olabileceği bildirilmiştir (Yıldırım ve ark., 2019; Kou ve ark. 2021). Bu çalışmada, Kayseri ilinde satışa sunulan farklı hayvan türlerine ait 500 çiğ süt örneğinden 380'ninin KPS olduğu ve bunlardan %60,5'inin kontaminasyon düzeyinin  $1 \times 10^2$  ila  $\geq 10^5$  kob/mL arasında olduğu belirlendi. Bu sonuçlar Polonya, Portekiz, İtalya, Yeni Zelanda, Norveç, Hindistan ve Çin gibi birçok ülkede yapılan çalışmalarda belirlenen prevalans (yaklaşık %40-70) ile uyumlu idi (Bianchi ve ark., 2014; Sudhanthiramani ve ark., 2015; 2016; Liu ve ark., 2017; Ahmed ve ark., 2019; Kou ve ark., 2021; Oliveira ve ark., 2022). Stafilokokların doğada yaygın olarak bulunması ve mastitisin ana nedenlerinden biri olması, çiğ sütteki bu yüksek prevalansa neden olabilir (Kaya ve ark., 2015; Ahmed ve ark., 2019). Hayvanlarda meme sağlığı, sağım esnasındaki hijyen, düşük depolama sıcaklığı gibi kontrol önlemleri ile enterotoksinjenik *S. aureus*'ların üremesi engellenebilir (Kaya ve ark., 2015; Ahmed ve ark., 2019; Oliveira ve ark., 2022).

Bu çalışmada tespit edilen KPS izolatlarının %35.7'si *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Çalışma kapsamında incelenen izolatlar da en yüksek *S. aureus* prevalansı %38.2 ile koyun sütünde bulunurken bunu

%35.2 ve %26.4 ile sırasıyla inek ve manda sütü takip etti. Benzer şekilde Sudhanthiramani ve ark. (2015) tarafından Hindistan'da ve Keyvan ve ark. (2020) tarafından Türkiye'de, çiğ sütte yapılan çalış-

malarda *S. aureus* varlığı sırasıyla %39 ve %38.3 olarak bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçlarından farklı olarak, %12.5'lik bir prevalansı ile Zeinhom ve Abed (2020) %14'lük bir prevalans ile Ertaş ve Gönülalan (2010) ve yine %14'lük bir prevalans ile Omwenga ve ark. (2019) süt örneklerinde nispeten daha düşük *S. aureus* prevalansı, Bianchi ve ark. (2014) ve Kou ve ark. (2021) ise daha yüksek *S. aureus* prevalansı (sırasıyla %40 ve %43) bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2022) tarafından gerçekleştirilen küresel bir meta-analiz çalışmasına göre, *S. aureus*'un prevalansı dünya genelinde inek, manda ve koyun sütünde sırasıyla %35, %33.4 ve %18.5 olarak rapor edilmiştir. Bu bulgular, çalışmamızdaki prevalans sonuçlarıyla uyumlu idi.

Ülkemizde çiğ sütlerde ilgili etkene ilişkin yasal bir sınır olmamasına rağmen (T GK, 2000), *S. aureus*'un gıdalarda  $>10^5$  kob/mL kontaminasyon düzeyine ulaştığında enterotoksin üretim olasılığını arttırarak gıda zehirlenmelerine neden olabileceği bildirilmiştir (Rahimi ve ark., 2012; Ahmed ve ark., 2019). Çalışma kapsamında incelenen *S. aureus* izolatlarının % 7.3'ü klasik SE sentezleme yeteneğine sahipti. Bu izolatların 4'ü SEA, 3'ü SEC ve 3'ü SED sentezliyordu. Bu sonuçlar Keyvan ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışma sonuçlarına göre yüksek iken, daha önce farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda rapor edilen enterotoksin prevalansından (Asiimwe ve ark., 2017; Ahmed ve ark., 2019) oldukça düşük idi. Bu çalışmalar ile uyumlu olarak en yaygın tespit edilen enterotoksin SEA idi. Stafilocokal gıda zehirlenmeleri vakalarının %95'inden klasik enterotoksinler sorumludur. Özellikle SEA ve SED, zehirlenmelerden sorumlu baskın enterotoksinlerdir (Ahmed ve ark., 2019). Enterotoksijenik *S. aureus* prevalansındaki farklılıkların nedenleri daha önce bildirildiği gibi farklı gıdaların ve suşların, farklı enterotoksinler taşıması ve coğrafi koşullar olabilir (Morandi ve ark., 2007; Asiimwe ve ark., 2017). Ayrıca bu çalışmada belirlenen klasik enterotoksin prevalansı ile uyumlu olarak, *S. aureus* izolatlarının %11.7'sinin bu toksinlerin üretiminden sorumlu genleri içeriyordu. Bu genlerin dağılımı sırası ile 6'sı sea, 5'i sed, 4'ü sec ve 1'i seb şeklinde idi. Yapılan literatür taramasına göre enterotoksin genlerinin yaygınlığı, Morandi ve ark. (2007), Omwenga ve ark. (2019) ve Oliveira ve ark. (2022) tarafından bildirilen sonuçlar (sırasıyla %67, %74.1 ve %46.8) ile çalışmamız sonuçlarına göre oldukça yüksek iken, Keyvan ve ark. (2020)'nin sonuçları (%16) çalışmamıza benzer idi. Daha önce Normanno ve ark.'nin (2005) bildirdiği gibi çalışmamızda da *S. aureus*'un enterotoksijenik suşlarında en sık gözlenen enterotoksin geninin klasik sea geni olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Morandi ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, sea ve sed genlerinin diğer genlere oranla daha yaygın olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada klasik SE'leri kodlayan genlerin bir kısmının tespit edilmesi, bakterinin uygun sıcaklık ve koşullarda bu

enterotoksinleri çiğ sütte üreterek gıda zehirlenmelerine neden olabileceğini düşündürmektedir (Omwenga ve ark., 2019).

Sonuç olarak; çiğ sütlerde enterotoksijenik *S. aureus*'un varlığı, tüketicinin çiğ süte olan ilginin artması ve bu sütlerden üretilen ürünlerin tüketilmesi ile halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturabilir. Ayrıca ülkemizde çiğ sütlerde *S. aureus* ve enterotoksinleri ile ilgili yasal bir izleme programının olmayışı bu patojenin besin zinciri yoluyla yayılma riskini arttırmaktadır. Bu nedenle, Stafilocokal gıda zehirlenmeleri ve ekonomik kayıpların önüne geçilebilmesi amacıyla, çiğ sütün toplama, taşıma, depolama ve satış aşamalarında denetimlerinin yapılması için yasal düzenlemelerin geliştirilmesi, uygulanması gerekmektedir. Ayrıca süt işletmelerinde iyi hijyen uygulamalarının takip edilmesi ve personele sağım ve kişisel hijyen konusunda kapsamlı eğitimlerin planlanarak periyodik olarak verilmesi bu patojenin besin zincirinde çoğalarak yayılmasını sınırlandırabilir.

#### Kaynaklar

- Ahmed AAH, Maharik NMS, Valero A, Kamal SM. Incidence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk and Egyptian artisanal dairy products. Food Control 2019; 104: 20-7.
- Asiimwe BB, Baldan R, Trovato A. Prevalence and molecular characteristics of *Staphylococcus aureus*, including methicillin resistant strains, isolated from bulk can milk and raw milk products in pastoral communities of South-West Uganda. BMC Infect Dis 2017; 17: 422.
- Bianchi DM, Gallina S, Bellio A, Chiesa F, Civera T, Decastelli L. Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. Lett Appl Microbiol 2014; 58: 190-6.
- Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Castiglioni B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol Cell Probes 2005; 19(5), 299-305.
- Dhanashekar R, Akkinepalli S, Nellutla A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. Germs 2012; 2(3): 101.
- Ertaş N, Gönülalan Z. Kayseri ilinde satılan çiğ sütlerde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinlerinin varlığı üzerine araştırmalar. Fırat Univ Sağlık Bilim Vet Derg 2010; 24(1): 11-5.
- Féraudet Tarrisse C, Goulard-Huet C, Nia Y, Devilliers K, Marcé D, Dambrune C, Simon S. Highly sensitive and specific detection of staphylococcal enterotoxins SEA, SEG, SEH, and SEI by immunoassay.

- Toxins 2021; 13(2): 130.
- Garcia SN, Osburn BI, Jay-Russell MT. One health for food safety, food security, and sustainable food production. *Front Sustain Food Syst* 2020; 4: 1.
- Goto M, Hayashidani H, Takatori K, Hara-Kudo Y. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* harbouring genes for four classical enterotoxins, SEA, SEB, SEC and SED, by loop-mediated isothermal amplification assay. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45(1): 100-7.
- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(4): 815-36.
- Kaya H, Ertaş Onmaz N, Gönülalan Z, Al S. Kayseri ilinde tüketime sunulan tavuk etlerinde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 2015; 12(2): 93-8.
- Keyvan E, Yurdakul O, Şen E. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk: A screening study. *Kocatepe Vet J* 2020; 13(2): 104-9.
- Kou X, Cai H, Huang S, Ni Y, Luo B, Qian H. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw milk in Northern Xinjiang, China. *Front Microbiol* 2021; 12: 2187.
- Liu H, Li S, Meng L, Dong L, Zhao S, Lan X. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. *J Dairy Sci* 2017; 100: 8796-803.
- Liu C, Shen Y, Yang M, Chi K, Guo N. Hazard of Staphylococcal enterotoxins in food and promising strategies for natural products against virulence. *J Agric Food Chem* 2022; 70(8): 2450-65.
- Morandi S, Brasca M, Lodi R, Cremonesi P, Castiglioni B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol* 2007; 124(1-2): 66-72.
- Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Celano GV. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* 2005; 98(1): 73-9.
- Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins* 2018; 10(6): 252.
- Oliveira R, Pinho E, Almeida G, Azevedo NF, Almeida C. Prevalence and diversity of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw milk from Northern Portugal. *Front Microbiol* 2022; 13: 703.
- Omwenga I, Aboge GO, Mitema ES, Obiero G, Ngaywa C, Ngwili N, Bett B. *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes detected in milk from various livestock species in northern pastoral region of Kenya. *Food Control* 2019; 103: 126-32.
- Rahimi E, Momtaz H, Shakerian A, Kavyani HR. The detection of classical enterotoxins of *Staphylococcus aureus* in raw cow milk using the ELISA method. *Turkish J Vet Anim Sci* 2012; 36(3): 319-22.
- Sankomkai W, Boonyanugomol W, Krairiwattana K, Nuchanon J, Boonsam K, Kaewbutra S, Wongboot W. Characterisation of classical enterotoxins, virulence activity, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Thai fermented pork sausages, clinical samples, and healthy carriers in northeastern Thailand. *J Vet Res* 2020; 64(2): 289.
- Sudhanthiramani S, Swetha CS, Bharathy S. Prevalence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* from raw milk samples collected from the local vendors in the region of Tirupathi, India. *Vet World* 2015; 8(4): 478-81.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi) 2000. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 23960, Tebliğ No: 2001-19, Ankara, Türkiye.
- Yıbar A, Küçük SC. Çiğ süt ve pastörize süt tüketiminin halk sağlığı üzerine etkileri. *Food and Health* 2019; 5(3): 197-204.
- Yıldırım T, Sadati F, Kocaman B, Siriken B. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin detection in raw milk and cheese origin coagulase positive isolates. *IJSL* 2019; 1(1): 30-41.
- Yin HY, Fang TJ, Wen HW. Combined multiplex loop-mediated isothermal amplification with lateral flow assay to detect sea and seb genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* 2016; 63(1): 16-24.
- Zeinhom M, Abed A. Prevalence, characterization, and control of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and Egyptian soft cheese. *J Vet Med Res* 2020; 27(2): 152-60.
- Zhang J, Wang J, Jin J, Li X, Zhang H, Shi X, Zhao C. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Food Res Int* 2022; 162: 111969.