

Sağmal İneklerin Meme Baş Derileri ve Çiğ Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'ların Patojenite Özellikleri ile Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları*

Mustafa ALIŞARLI

Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Van (malisarli@yyu.edu.tr)

Hasan SOLMAZ

Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van

Geliş Tarihi : 21.04.2003

ÖZET: Bu çalışmada, sağmal ineklerin meme başı derileri ve çiğ süt örneklerinde *Staphylococcus aureus*'un yaygınlığı ve izole edilen *S. aureus*'ların termonükleaz ve enterotoksijenik özellikleri ile bunların bazı antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu amaçla, Van ili çevresindeki 5 farklı çiftlikten 100 sağmal süt ineğine ait 100 adet çiğ süt (80 adet süt örneği California Mastitis Test (CMT) negatif, 20 adet süt örneği CMT pozitif) örneği ile aynı ineklerin sağım öncesi meme başı derilerinden alınan yıkama suyu örnekleri *S. aureus* yönünden incelenmiştir. Meme başı derisi örneklerinin 38 (%38)'inde *S. aureus* bulunmuştur. *S. aureus*'ların 16 (%42)'si enterotoksin oluşturmuştur. Bunlardan 8'i enterotoksin tip A, 6'sı enterotoksin tip C ve 2'si enterotoksin tip D olarak belirlenmiştir. CMT negatif olan süt örneklerinin 19'unda (%23,7) *S. aureus* tespit edilmiş ve bunların 8 (%42)'inin enterotoksin oluşturduğu saptanmıştır. Enterotoksinlerin 4'ü enterotoksin tip C, 3'ü enterotoksin tip A ve 1'i enterotoksin tip D olarak belirlenmiştir. CMT pozitif olan süt örneklerinde *S. aureus* 12 örnekte (%60) identifiye edilmiş ve bunların 6 (%50)'sı enterotoksin oluşturmuş, 2'si enterotoksin tip A, 4'ü enterotoksin tip C olarak saptanmıştır. İzole edilen *S. aureus*'lar; amoksisiline (%42), kloksasiline (%44,3), eritromisine (%83), oksitetrasikline (%75), sulbaktam+ampisiline (%32), gentamisine (%100) ve sefaperazona (% 68) karşı duyarlı bulunmuştur. Çiğ ve özellikle subklinik mastitisli sütlerin, besin zehirlenmelerinde rol oynayan enterotoksijenik *S. aureus*'lar açısından yüksek oranda bir risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca sonuçlar, sağım öncesi meme hijyeninin ve sağılan memenin düzenli olarak sağlık kontrolünün zorunlu olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Çiğ süt, *S. aureus*, Antiyotik duyarlılık, Enterotoksin, Mastitis

The Pathogenic Properties and the Varied Antibiotic Sensitivities of *S. aureus* Isolated from Teat Skin and Raw Milk of Dairy Cows

ABSTRACT : The purpose of this study was to investigate the prevalence of *Staphylococcus aureus*, the thermonuclease and enterotoxigenic properties and the sensitivities of isolated *S. aureus* to some antibiotics. One hundred raw milk samples obtained from 100 dairy cows from 5 different farms located in Van and cleaning water samples of teat skins of the same animals before swindling were investigated from the point of *S. aureus* infection. Of the milk samples, 80 were CMT negative and 20 were CMT positive. *S. aureus* was detected in 38 of all the teat skin samples. Enterotoxin was produced in 16 (42%) of all isolated *S. aureus*. Of them, 8 strains produced enterotoxin type A, 6 strains type C and 2 strains type D. In the CMT negative milk samples, 19 (23.7%) *S. aureus* were isolated and 8 (42%) of them produced enterotoxin. 4, 3 and 1 of enterotoxigenic strains produced type C, A and D respectively. In the CMT positive milk samples, 12 (60%) *S. aureus* were isolated and 6 (50%) of them produced enterotoxin while 2 and 4 of enterotoxigenic strains produced type A and C respectively. Isolated *S. aureus* were found to be sensitive to following antibiotics; amoxicillin (% 42), cloxacillin (% 44.3), erythromycin (% 83), oxytetracycline (% 75), sulbactam+ampicillin (% 32), gentamicin (% 100) and cefoperazone (% 68). The results obtained from this investigation indicate that raw milk and milk obtained from dairy cows with subclincic mastitic cause a great risk for the public health for enterotoxin producing *S. aureus* which plays an important role in food poisoning. Thus, the results show that before swindling, the udder hygiene should be given at most care and the udder should be inspected systematically.

Key Words: Raw milk, *S. aureus*, Antibiotic sensitivity, Enterotoxin, Mastitis

GİRİŞ

Besinlerin tüketilmesiyle meydana gelen infeksiyon ve intoksikasyonlar hala günümüzün önemli sağlık problemlerindedir. Dünyada en yaygın görülen besin kaynaklı mikrobiyal intoksikasyonlara, stafillokok enterotoksinleri neden olmaktadır (Genigeorgis, 1989; Bergdoll vd., 1992; Wieneke vd., 1993). Enterotoksin üreten stafillokok türleri içerisinde de halk sağlığı açısından en önemli tür *Staphylococcus aureus*'tur (Bryan, 1983). Bu nedenle familia içerisinde üzerinde en çok araştırma yapılan bakteri *S. aureus* olmuştur.

Yapılan çalışmalarla (Becker vd., 1987; Ecker ve Lenz, 1990; Bergdol vd.,1992), *S. aureus*'ların çiğ süttten

ve çeşitli süt içerikli gıdalardan izole edildiği ve bunların önemli bir kısmında enterotoksijenik özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda (Kıvanç vd., 1992; Küplülü vd., 2002; Sancak vd., 2002; Alışarlı vd., 2003) da, çiğ ve pastörize sütlerle süt içerikli gıdalarda *S. aureus* ve enterotoksinleri tespit edilmiştir.

Süt ürünlerinde *S. aureus*'ların başlıca kontaminasyon kaynakları; subklinik mastitisli hayvanlar, onların *S. aureus* içeren sütlerinin farkında olmaksızın kullanımı ve üretimde çalışan portör insanlardır (Ahmed vd., 1978; Umoh vd., 1990).

* YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından (2001-VF_%) desteklenmiş çalışmanın bir bölümüdür.

Özellikle mastitisli hayvanlardan sağılan sütler enterotoksijenik *S. aureus* suşlarının önemli bir kaynağıdır (Ahmed vd., 1978; Umoh vd., 1990; Ecker ve Lenz, 1990).

Enterotoksin oluşturan *S. aureus*'ların ön belirlenmesinde termonükleaz (Tnase) aktivitesinin tespiti önemli rol oynamaktadır (Tatini vd., 1976; Becker vd., 1984). Bir kısım araştırmacı (Tatini vd., 1976; Müller, 1993), *S. aureus* suşlarının %99'unun termonükleaz ürettiğini göstermiştir. Enterotoksin oluşturma ve termonükleaz aktivitesi özelliklerine ilaveten, koagülaz ve yumurta sarısı (lesitinaz) reaksiyonları da *S. aureus*'ların patojenite özellikleri arasında yer almaktadır (Terplan ve Zaadhof, 1978; Becker vd., 1987).

Bu çalışmada, sağmal ineklerin meme başı derisi ve çiğ süt örneklerinde *Staphylococcus aureus*'un yaygınlığı ve izole edilen *S. aureus*'ların yumurta sarısı, koagülaz, termonükleaz ve enterotoksijenik özellikleri ile bazı antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Van ili çevresindeki 5 farklı çiftlikten 100 sağmal süt ineğine ait 100 adet çiğ süt örneği ve sütü alınan ineklerin meme başı derilerinden sağım öncesi alınan yıkama suları (De Wit ve Kampelmacher, 1981) materyal olarak kullanılmıştır. Süt örnekleri, aseptik koşullarda direkt el sağımı ile Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF)'nun önerdiği şekilde alınmış (Du Toit, 1998) ve aynı zamanda klinik durumu (mastitis durumu) California Mastitis Test (CMT) ile kontrol edilmiştir (Schalm vd., 1971). Test sonucu sütler iki grupta toplanmıştır:

1. CMT negatif (80 süt örneği)
2. CMT pozitif (subklinik mastitis) (20 süt örneği)

Aseptik koşullar altında temin edilen yaklaşık 200'şer ml süt örneği ile meme başı derisi yıkama suyu soğuk zincir altında (Ice box, 32 l, Ice pack Frizet Mod.T350) laboratuara getirilmiş ve aynı gün analize alınmıştır.

Analizi yapılacak örnekten, iyice karıştırıldıktan sonra 1ml alınarak içerisinde 9 ml steril peptonlu fizyolojik tuzlu su (%0.85 NaCl + %0.1 pepton) bulunan deney tüpüne aktarılmış ve vortekslemeden (Nüve, NM 110) sonra örneğin dilüsyon serisi desimal olarak 10^{-7} 'e kadar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlardan 0.05 ml Baird Parker Agar'a (OXOID CM275) aktarılmış ve sonra besi yeri 37°C 'de 48 saat inkübe edilmiştir. Besi yerinde gelişen 1-3 mm çapında parlak, siyah (tellurit reaksiyonu) etrafı halesiz koloniler ile etrafı hale ile çevrili koloniler (yumurta sarısı veya lesitinaz reaksiyonu) içerisinde *S. aureus*'un izolasyonu ve identifikasyonu için 5 tipik ve/veya atipik koloni seçilerek, tüp plazma koagülaz testi (DIFCO 0803-46-5) ve Staphylect Plus (OXOID DR850M) testi uygulanmıştır (Baumgart, 1993).

Termonükleaz aktivitesi: Termonükleaz oluşturan *S. aureus*'ların belirlenmesinde Lachica vd. (1971) tarafından önerilen termonükleaz aktivitesi testi uygulanmıştır. Bu amaçla izole ve identifiye edilen *S. aureus*'lar BHI (Brain Heart Infusion) buyyona pasajlanmış ve 37°C 'de 16-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası buyyon kültürleri kaynar suda 15 dakika ısıtılmış ve sonra soğumaya bırakılmıştır. Üzerine 2 mm çapında delik (kuyucuk) açılmış Toulidine Blau-DNA Agar'a buyyon kültürlerinden 15 µl koyulmuş ve bu plaklar 37°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan 4 saat veya reaksiyon oluşmamışsa 24 saat sonra plaklar üzerine açılmış kuyucuk etrafında 1 mm'den büyük menekşe renginde hale oluşturanlar termonükleaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Enterotoksin Analizi: Enterotoksin oluşturan *S. aureus*'ların belirlenmesi için Reversed Passive Latex Agglutination ticari test kiti (OXOID, SET RPLA, TD900) kullanılmıştır. Bu test kiti ile, analiz örneklerinden identifiye edilmiş *S. aureus*'lar sadece A, B, C ve D tipi toksin oluşturma yetenekleri yönünden, üretici firmanın yönergesi doğrultusunda test edilmiştir. Bu amaçla; *S. aureus*'lar tek koloni halinde 10 ml BHI buyyona inoküle edilmiş ve 37°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası buyyon kültürleri 4°C 'de 3000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüje edilmiş ve elde edilen supernatta toksin tespiti yapılmıştır (Rose vd., 1989).

Uygulanan testlerinin pozitif kontrollerinde Dr. B. Holmes, NCTC (National Collection of Type Cultures Public Health Laboratory Service, Londra)'den temin edilen SEA 10652 FDA 196E, SEB 10654 FDA 243, SEC 10655 137 ve SED 10656 494 *S. aureus* suşları ve negatif kontrollerde ise Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *S. epidermidis*-33 suşu kullanılmıştır.

Antibiyogram: İzole edilen ve identifiye edilen *S. aureus*'ların antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının araştırılmasında Kirby-Bauer tarafından önerilen disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Bauer vd., 1966). Disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek, tablo değerleri ile karşılaştırılıp dirençli ya da duyarlı oldukları belirlenmiştir. Çalışmada, amoksisilin, kloksasilin, eritromisin, oksitetrasiklin, sulbaktam +ampisilin, gentamisin ve sefaperazon antibiyotikleri test edilmiştir.

İstatistiksel analiz: CMT (-) ile CMT (+) süt örneklerindeki ve süt örnekleri ile meme derisi örneklerindeki *S. aureus*'un izolasyon değerleri arasındaki farklılıkların önem derecesi chi square (χ^2) testi ile hesaplanmıştır (Akgül, 1997).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çiğ süt ve meme başı derisi örneklerinde saptanan stafilkokların patojenite özelliklerine göre dağılımı Tablo 1, 2 ve 3'te sunulmuştur.

Bu çalışmada, CMT negatif (Tablo 1) süt örneklerinin 19 (%23,7)'unda ve CMT pozitif (Tablo 2) süt örneklerinin 12 (%60)'sinde olmak üzere toplam 31 (%31) süt örneğinde *S. aureus* tespit edilmiştir. Örneklerdeki *S. aureus*'un izolasyon değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,001$).

Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda; Seikh ve Luedecke (1974), Pakistan'da tüketime sunulan 86 süt örneğinin 3 (%3,5)'ünde ve Santos vd. (1981), çiğ sütlerin %46,9'unda *S. aureus* belirlemişler ve oranın bu şekilde yüksek çıkmasını mastitisli süt kullanımı ile süt sağım hijyenine uyulmamasına bağlamışlardır. Ahmed vd. (1978), inceledikleri 200 adet süt ve ürününden 57 (%28)'sinde Tnase pozitif *S. aureus* (bunların 52'sinin yumurta sarısı reaksiyonu pozitif) saptamışlardır. Ombui vd. (1992), *S. aureus*'u Kenya'da inceledikleri 300 çiğ süt örneğinin 183 (%61)'ün de bulmuşlardır. Kıvanç vd. (1992), Eskişehir'de inceledikleri 36 adet çiğ süt örneğinin tamamında *S. aureus*'u bulduklarını bildirmişlerdir.

Mastitisli süt örneklerinde yürütülen araştırmalarda ise, Müller (1993) *S. aureus*'u mastitisli süt örneklerinin %63,5'inde, Abbar vd. (1986) %67'sinde ve Garcia vd. (1980) %80'ninde belirlemişlerdir. Otsuka vd. (1992), *S. aureus*'u, subklinik mastitisli 101 sığırdan topladıkları 400 süt örneğinin 38 (%9,5)'inde bulduklarını bildirmişlerdir. Centorbi vd. (1992), *S. aureus*'u subklinik mastitisli 163 sığırdan 103 (%63)'ünde belirlemişlerdir. Ateş vd. (1991), *S. aureus*'u Konya yöresindeki mastitisli sığırlardan alınan 429 süt örneğinin 212 (%54,3)'sinde saptamışlardır. Gülhan

(1998), subklinik mastitis şüpheli ineklerden aldığı 151 süt örneğinin 50 (%33,1)'sinde *S. aureus* belirlemiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, bazı araştırmacıların (Santos vd., 1981; Ombui vd., 1992; Kıvanç vd., 1992) sonuçlarından düşük, Seikh ve Luedecke (1974)'nin sonuçlarından oldukça yüksektir. Ahmed vd. (1978)'nin bulgularıyla ise benzerlik göstermektedir. Ayrıca, subklinik mastitisli sütlerde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında bazı çalışma (Abbar vd., 1986; Ateş vd., 1991; Centorbi vd., 1992; Müller, 1993) sonuçları ile uyum göstermiş, bir kısım çalışma (Gülhan, 1998; Otsuka vd., 1992) sonuçlarından yüksek bulunmuştur.

Sonuçlar arasındaki bu farklılıklar; örnek alma zamanı, şekli ve kullanılan metotlara bağlanılabileceği gibi, analizlerin yapıldığı mevsimsel farklılıktan da kaynaklanmış olabilir. Zira, bazı araştırmacılar (Kielwein, 1977; Kıvanç vd., 1992) da çalışmalarında sonuçlar üzerine mevsimsel farklılığın etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, meme başı derisi üzerinde 38 (%38) örnekte *S. aureus* bulunmuştur (Tablo 3). Yapılan literatür taramalarında, çalışmamıza benzer şekilde bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak, meme derisi florasının hayvanın genel deri florası ile benzer floraya sahip olabileceği ve hayvan derisinin *S. aureus*'ların kontaminasyonunda önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Asperges, 1998). Adams ve Moss (1995)'a göre, *S. aureus*'lar deriden sıklıkla izole edilen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Tüm süt örnekleri ile meme derisi örneklerindeki *S. aureus*'un izolasyon değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$).

Tablo 1. CMT negatif çiğ süt örneklerinde saptanan stafilocokların patojenite özelliklerine göre dağılımı ve oluşturdukları toksin tipleri

CMT negatif örnek	Üreme pozitif örnek	Yumurta sarısı reaksiyonu	Koagula z pozitif	Tnase pozitif	<i>S.aureus</i>	Toksin tipleri ve (adedi)
80	68	68 negatif 35 pozitif	7 21	4 15	4 15	C (2) A (3), C (2), D
Toplam			28	19	19 %23,7	8 % 42

Tablo 2. CMT pozitif çiğ süt örneklerinde saptanan stafilocokların patojenite özelliklerine göre dağılımı ve oluşturdukları toksin tipleri

CMT pozitif örnek	Üreme pozitif örnek	Yumurta sarısı reaksiyonu	Koagula z pozitif	Tnase pozitif	<i>S.aureus</i>	Toksin tipleri ve (adedi)
20	20	20 negatif 15 pozitif	5 10	4 8	4 8	A, C A, C (3)
Toplam			15	12	12 %60	6 % 50

Tablo 3. Meme başı derisi örneklerinde saptanan stafilocokların patojenite özelliklerine göre dağılımı ve oluşturdukları toksin tipleri

Örnek sayısı	Üreme pozitif örnek	Yumurta sarısı reaksiyonu	Koagula z pozitif	Tnase pozitif	<i>S.aureus</i>	Toksin tipleri ve (adedi)
100	84	84 negatif 70 pozitif	13 37	10 28	10 28	A (2), C A (6), C (5), D(2)
Toplam			50	38	38 %38	16 % 42

S. aureus suşlarının yaklaşık %50'sinin 1 veya daha fazla tipte enterotoksin oluşturabileceği bildirilmiştir (Carter vd., 1995). Schlendest ve Kielwein (1994), mastitis problemi olduğu düşünülen hayvanlara ait sütlerden izole ettikleri 154 adet *S. aureus* suşunu enterotoksijenik özellikleri yönünden incelemişler ve bunların %24'ünün enterotoksin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ahmed vd. (1978), süt ve süt ürünlerinden izole edilen 57 adet Tnase pozitif *S. aureus*'un 27 (%47,4)'sinin enterotoksijenik karakterde olduğunu belirlemişlerdir. Ombui vd. (1992), çiğ süt örneklerinden izole edilen 183 adet *S. aureus*'un %53'ünün enterotoksijenik nitelikte olduğunu belirtmişlerdir. Müller (1993), İsviçre'de mastitisli sığır sütlerinden izole ettiği 398 adet *S. aureus*'un %42,2'sinin enterotoksin oluşturduğunu tespit etmiştir. Bolstridge ve Roth (1985), mastitisli sütlerden elde ettikleri 38 adet *S. aureus*'un %18,4'ünün enterotoksin oluşturduğunu saptamışlardır.

Yürütülen bu çalışmada, saptanan *S. aureus*'lar CMT negatif olan süt örneklerinde %42, CMT pozitif olan süt örneklerinde %50 ve meme başı derisi üzerinden alınan örneklerde de %42 oranında enterotoksijenik özellikte bulunmuştur. Bu değerler bazı araştırmacıların (Bolstridge ve Roth, 1985; Schlendest ve Kielwein, 1994) bulduğu oranlardan yüksek, bazı araştırmacıların (Ahmed vd., 1978; Ombui vd., 1992; Müller, 1993; Carter ark., 1995) bildirdiği değere yakın bulunmuştur.

Bu çalışmada dikkat çekici olan, subklinik mastitisli süt (CMT pozitif) örneklerinde hem enterotoksin oluşturan hem de oluşturmayan *S. aureus*'ların bulunma oranının normal çiğ süt (CMT negatif) örneklerinden daha yüksek oluşudur (Tablo 1-2). Birçok araştırmacı (Ahmed vd., 1978; Umoh vd., 1990; Ecker ve Lenz, 1990), süt ve ürünleri için *S. aureus*'larla en önemli kontaminasyon kaynağı olarak mastitisli sütleri göstermişlerdir. Schlendest ve Kielwein (1994), özellikle klinik olarak hasta hayvan sütlerinden izole edilen *S. aureus*'ların toksin oluşturma oranlarının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yürütülen bu çalışmada da, enterotoksijenik *S. aureus*'lar subklinik mastitisli sütlerde sağlıklı sütlerle göre daha yüksek oranda (%50) belirlenmiştir (Tablo 2).

Çiğ sütlerden izole edilen *S. aureus* suşları farklı enterotoksinler oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Hamama, 1987). Süt ürünlerinden izole edilen *S. aureus* suşları çoğunlukla A tipi enterotoksin oluşturmakta ve bunlar çoğunlukla ürüne insanlar tarafından bulaştırılmaktadır (Hamama, 1987). Bazı araştırmacılara (Harvey ve Gilmour, 1988; Ecker ve Lenz, 1990; Ombui vd., 1992; Müller, 1993) göre ise, özellikle mastitisli sütlerde enterotoksin C oluşturan suşlar daha sık bulunmaktadır. Harvey ve Gilmour (1988) inceledikleri keçi sütünde diğer enterotoksijenik suşların yanı sıra enterotoksin C oluşturan suşu %35 oranında bulmuşlardır. Ombui vd. (1992) Kenya'da inceledikleri çiğ süt örneklerinde enterotoksin C oluşturan suşu %95.8

oranında belirlemişlerdir. Schlendest ve Kielwein (1996) mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarından 3 adet B (%1,9), 30 adet C (%19,4) 2 adet D (%1) ve 1 adet B/D (%0,6) tipi enterotoksin saptamışlardır.

Bu çalışmada, tüm süt örneklerinde (CMT negatif ve pozitif) 5 (%35,7)'i enterotoksin tip A, 8 (%57,1)'i enterotoksin tip C ve 1 (%7)'i enterotoksin tip D olan toplam 14 (%45,1) adet enterotoksijenik *S. aureus* belirlenmiştir (Tablo 1-2). Meme başı derisinde 8 (%50)'i enterotoksin A, 6 (%37,5)'si enterotoksin C ve 2 (%12,5)'si enterotoksin D olan toplam 16 adet enterotoksijenik *S. aureus* saptanmıştır (Tablo 3). Yani, süt örneklerinde C tipi, meme derisi üzerinde ise A tipi enterotoksin oluşturan *S. aureus*'lar daha yüksek oranda saptanmıştır. Bu sonuçlar, bazı araştırmacıların bildirdiği süt orijinli *S. aureus*'lar daha çok C tipi enterotoksin (Harvey ve Gilmour, 1988; Ecker ve Lenz, 1990; Ombui vd., 1992; Müller, 1993), çevre ve insan kaynaklı olanlar ise A tipi enterotoksin (Hamama, 1987; Alişarlı vd., 2003; Küplülü vd., 2002) oluşturur savını doğrulamaktadır.

Bazı araştırmacılar (Terplan ve Zaadhof, 1978; Becker vd., 1987; Müller, 1993), *S. aureus*'un ön seleksiyonu için koagulaz ve termonükleaz özelliklerini ve kısmen de yumurta sarısı reaksiyonunu önemli belirleyici bir kriter olarak görmektedirler. Sinell (1978), *S. aureus*'ların belirlenmesinde ilk seçici kriter olarak sadece yumurta sarısı reaksiyonu veren kolonilerin değil, aynı zamanda yumurta sarısı reaksiyonu negatif olanların da dikkate alınması gerektiğini belirtmiştir.

Becker vd. (1987) inek sütlerinden izole ettikleri 267 adet *S. aureus* suşundan %34,5'inin yumurta sarısı, %99,2'sinin koagulaz ve tamamının termonükleaz reaksiyonu pozitif olarak sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Müller (1993) mastitisli inek sütlerinden izole ettiği 398 adet *S. aureus*'un %36,6'sının yumurta sarısı, %100'ünün koagulaz ve %99,7'sinin termonükleaz aktivitesini pozitif bulmuştur. Ahmed vd. (1978) süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri Tnase pozitif *S. aureus*'ların %91,2 (52/57)'sinin yumurta sarısı reaksiyonuna sahip olduklarını saptamışlardır.

Yürütülen bu çalışmada, tüm analiz örneklerinde yumurta sarısı negatif olan stafilocokların %16,2 (28/172)'si, yumurta sarısı pozitif olan stafilocokların %42,5 (51/120)'i, koagulaz pozitif olan stafilocokların %68,3 (69/101)'ü ve termonükleaz aktivitesi pozitif olan stafilocokların tamamı *S. aureus* olarak saptanmıştır. Ayrıca, yumurta sarısı negatif olan stafilocokların %9 (7/172), yumurta sarısı pozitif olan stafilocokların %19,2 (23/120)'si, koagulaz pozitif olan stafilocokların %29,7 (30/101)'si ve termonükleaz aktivitesi pozitif olan stafilocokların %43,4 (30/69)'ü enterotoksijenik özellikte belirlenmiştir (Tablo 1 ve 2).

Bu sonuçlar, bir kısım araştırmacının (Sinell, 1978; Becker vd., 1987; Müller, 1993) belirttiği gibi, özellikle süt kaynaklı gıdalarda yumurta sarısı reaksiyonu negatif

olan kolonilerinde dikkate alınmasının gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmanın sonuçları, termonükleaz aktivitesine sahip olan *S. aureus* oranlarının daha yüksek olması nedeniyle, bazı araştırmacılar (Tatini vd., 1976; Becker vd., 1984; Alişarlı vd., 2003) tarafından enterotoksijenik *S. aureus*'ların ön seleksiyonunda bu 3 özellik içerisinde sadece termonükleaz aktivitesinin "ilk belirleme testi" olarak kabul görmesini açıklamaktadır.

S. aureus'a bağlı meme yangılarıyla mücadele çalışmaları, sadece etkeninin sütte bulunmaması ile ilgili değil aynı zamanda gıda zehirlenmelerine karşı korunma açısından da oldukça önemlidir (Ateş vd., 1991). Stafilocok enfeksiyonlarında sağaltım amacıyla uzun yıllardan beri penisilin türevleri kullanılmış (White vd., 1963), ancak zaman içinde, stafilocoklar ürettikleri penisilinaz (β -laktamaz) enzimi ile bu antibiyotiğe karşı direnç geliştirmişlerdir (Akova, 1994).

Birçok araştırmacı (Müller, 1975; Francis vd., 1986; Lopes vd., 1990; Boynukara vd., 1991; Ateş vd., 1991; Müller, 1993; Gülhan, 1998), izole ve tanımladıkları *S. aureus*'ları bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları veya dirençlilikleri yönünden araştırmışlardır. Bu araştırmacıların bulguları, bu çalışmada test edilen antibiyotikler ile benzer olanlar dikkate alınarak Tablo 4'te sunulmuştur.

Yürütülen bu araştırmada da, izole ve tanımladıkları *S. aureus*'lar duyarlılıkları yönünden bazı antibiyotiklere karşı test edilmiş ve amoksisiline (%42), kloksasiline (%44,3), eritromisine (%83), oksitetrasikline (%75), sulbaktam+ampisiline (%32), gentamisine (%100) ve sefaperazona (% 68) karşı duyarlı bulunmuştur (Şekil 1).

Literatürlerde *S. aureus*'ların amoksisiline karşı duyarlılığı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmazken, diğer antibiyotikler yönünden bu çalışmanın sonuçları, Tablo 4'te sunulan sonuçlardan farklı bulunmuştur. Sadece oksitetrasiklin ve gentamisin ile ilgili test sonuçları kısmen paralellik göstermiştir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar, muhtemelen test edilen suşların farklılığından ve orijininden kaynaklanmaktadır.

Yürütülen bu çalışmada, ayrıca analiz edilen örnekler içerisinde *S. aureus*'un bakteri yoğunluğu da araştırılmıştır. Çiğ sütte pozitif örnekler içerisinde *S. aureus*'ların maksimum, minimum ve ortalama değerleri sırasıyla $2,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^2$ ve $3,0 \times 10^2$ kob/ml iken; meme başı derisinde $5,0 \times 10^4$, $2,0 \times 10^2$ ve $4,0 \times 10^2$ kob/l meme başı derisi yüzeyi olarak bulunmuştur.

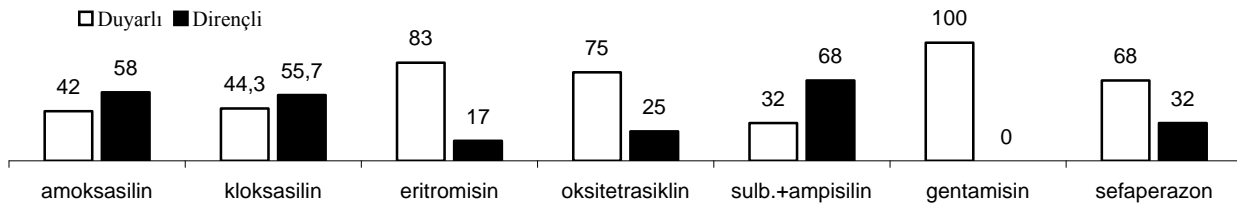
Kıvanç vd. (1992), Eskişehir'de tüketilen çiğ sütlerde *S. aureus* sayısını $1,25 \times 10^2$ - $8,9 \times 10^5$ kob/ml arasında, ortalama $1,82 \times 10^3$ kob/ml düzeyinde saptamışlardır. Ankara'da pastörize sütlerde yapılan bir araştırmada (Sarımehtemetoğlu vd., 1996), örneklerin %44'ünde 2×10^1 kob/ml düzeyinin üzerinde koagülaz pozitif stafilocok görülmüştür. İki örnek grubunda *S. aureus*'ların yaklaşık aynı düzeylerde bulunması dikkat çekicidir. Bu bakteri açısından iki grup arasında önemli ($P < 0,05$) pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Bu da, bu bakterinin sütte kontamine olmasında meme başı derisinin önemli rol oynadığını göstermektedir.

Bu araştırmada, *S. aureus*'ların subklinik mastitisli süt ve memeden elde edilen örneklerde, sağlıklı süt ve memeden elde edilen örnekler göre daha yoğun olarak belirlenmiş olması, hastalıklı memeden elde edilen sütlerin önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğunu göstermiştir.

Tablo 4. Sağlıklı ve mastitisli sütlerden izole edilen *S. aureus*'ların bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları (%).

Kaynak	Kloks.	Eritro.	Oksitetr.	Sulb.+Amp	Genta.	Sefaper.
Müller, (1975)	99	99	76	71	-	-
Francis vd.,(1986)	-	100	-	36,5	-	-
Lopes vd., (1990)	-	-	-	-	100	100
Boynukara vd., (1991)	-	75	-	-	-	-
Ateş vd., (1991)	-	68,1	50,2	37,8	-	72,4
Müller, (1993)	99,8	99,5	-	-	99,8	-
Gülhan, (1998)	-	74	-	96	-	-

-.:incelenmemiş, kloks.:kloksasilin, eritro.:eritromisin, oksitetr.:oksitetrasiklin, sulb.+amp.:sulbaktam+ampisilin, genta.:gentamisin, sefaper.:sefaperazon



Şekil 1. Saptanan *S. aureus*'ların bazı antibiyotiklere duyarlılık ve dirençlilik oranları (%)

Sonuçlara göre, ayrıca subklinik mastitisli sütlerin hem enterotoksin oluşturan hem de oluşturmeyen *S. aureus*'lar için önemli bir rezervuar olduğu belirlenmiştir. *S. aureus*'un belirlenmesinde, koagulaz ve termonükleaz aktivitesi önemli kriter olarak bulunmuş, bununla birlikte, *S. aureus*'u belirlemede yumurta sarısı reaksiyonu veren (tipik) ve vermeyen (atipik) kolonilerin de dikkate alınmasının gerekli olduğu görülmüştür.

Öz olarak sonuçlar, çiğ ve özellikle de subklinik mastitisli sütlerin yanı sıra meme derisinin de gıda zehirlenmelerinde rol oynayan enterotoksijenik *S. aureus*'lar açısından yüksek oranda bir risk oluşturabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, *S. aureus*'un eliminasyonunda sağılan memenin düzenli olarak sağlık kontrolünün yapılması ve sağım öncesi meme hijyenine gerekli özenin gösterilmesi önemli bulunmuştur. Bunu sağlamak için de, süt üreticilerinin meme sağlığı ve hijyenik kuralları hakkında bilgilendirilmesi zorunludur.

KAYNAKLAR

- Abbar, F.M., Mohammed, M.T., Arslain, S.H., 1986. Selected biological properties of enterotoxigenic staphylococci isolated from milk. *J. Food. Prot.*, 49: 871-873.
- Adams, M.R., Moss, M.O., 1995. Microbiology of primary food commodities. "Alınmıştır. *Food Microbiology*". S. 113-119. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 398 sayfa.
- Ahmed, A.A., Terplan, G., Simon, E., 1978. Enterotoxigenicity of staphylococcal strains isolated from milk and dairy products. *Arch. für Lebensmittelhyg.* 29: 212-214.
- Akgül, A., 1997. Tıbbi araştırmalarda istatistiksel analiz teknikleri, SPSS uygulamaları, YÖK Matbaası, Ankara.
- Akova, M., 1994. Beta-laktam antibiyotiklerin klinik kullanımı ve betalaktamazlara bağlı direnç gelişimi. *ANKEM Derg.*, 8(4) 305-310.
- Alişarlı, M., Sancak, Y.C., Akkaya, L., Elibol, C., 2003. Bazı sütli gıdalarda *staphylococcus aureus* izolasyonu, termonükleaz aktivitesi ve enterotoksijenik özelliklerinin araştırılması, *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, (Baskıda).
- Asperges, H., 1998. *Staphylococcus aureus*. "Alınmıştır. Çiğ sütte patojen mikroorganizmalar. Ed. Ö., Kınık, S., Gönç, A.S., Akalın". Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayını, İzmir.
- Ateş, M., Erganiş, O., Çorlu, M., 1991. Konya yöresindeki mastitisli ineklerden elde edilen süt örneklerinin mikrobiyal florası. *Doğ-Tr-J. Veterinary and Animal Sci.*, 16: 19-29.
- Bauer, A.N., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. Clin. Path.*, 36: 493-496.
- Baumgart, J., 1993. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel. Behrs Verlag, Hamburg.
- Becker, H., El-Bassiony, T.A., Terplan, G., 1984. Zur Abgrenzung der *S. aureus*-Tnase von hitzestabilen Nucleasen anderer Bakterien. *Arch. für Lebensmittelhyg.* 35: 114-118.
- Becker, H., Zaadhof, K.J., Terplan, G., 1987. Zur Charakterisierung von *S. aureus*-Stämmen des Rindes unter besonderer Berücksichtigung des Klumpungsfaktors. *Arch. für Lebensmittelhyg.* 38: 12-19.
- Bergdoll, M.S., Do Carmo, L.S., Sikorski, W., De Olivera Filho, M., 1992. Staphylococcal food poisoning in Brazil. 3rd World Congress/Foodborne infections and intoxications (WHO-FHO). B35: 320-322.
- Bolstridge, M.C., Roth, G., 1985. Enterotoxigenicity of strains *S. aureus* isolated from milk and milk products. *S. Afr. Tydskrif-Vir-Suiwelkunde.* 17(3) 91-95.
- Boynukara, B., Timurkan, H., Kuyucuoğlu, Y., 1991. İnek sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları üzerinde bir araştırma. *Veterinarium.* 2(3-4) 13-16.
- Bryan, F.L., 1983. Epidemiology of milk-borne diseases. *J. Food Prot.* 110: 519-531.
- Carter, G.R., M.M., Chengapa, A.W., Roberts, G.W., Claus, Rikihisa, Y., 1995. *Essential of Veterinary Microbiology*, Ed.: Cann C, Vol 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Pp:109-241.
- Centorbi, O.N.P., Caudrada, A.M.A., Alcaraz, L.E., Laciari, A.L., Milan, M.C., 1992. Prevalence of *S. aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the dairies of San Luis city. *Revista Argentina de Microbiol.*, 24(2) 73-80.
- De Wit, J.C., Kampelmacher, E.H., 1981. Some aspects of microbial contamination of hands of workers in food industries. *Zbl. Bakt. Hyg. I. abt. Org. B.* 172, 390-400.
- Du Toit, J., 1998. Örnek alma. "Alınmıştır. Çiğ sütte patojen mikroorganizmalar. Ed. Ö., Kınık, S., Gönç, A.S., Akalın". Ege Üniv. Ziraat Fak. Yayını, İzmir.
- Ecker, C., Lenz, W., 1990. Enterotoxinnachweis und Lysotypie bei *Staphylococcus aureus* in Rahmen der Speiseüberwachung. *Arch. für Lebensmittelhyg.* 41: 120-126.
- Francis, P.G., Carroll, P.J., 1986. Antibiotic resistance patterns of *S. aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis. *Vet. Rec.*, 118: 361-363.
- Garcia, M.L., Moreno, B., Bergdoll, M.S., 1980. Characterization of *Staphylococci* isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 548-553.
- Genigeorgis, C.A., 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* 9: 327-360.
- Gülhan, T., 1998. İnsan ve sığır orijinli *S. aureus* suşlarının çeşitli biyokimyasal özellikleri ile Antibiyotiklere duyarlılıklarının karşılaştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniv. Sağlık Bil. Derg.*, 3(1) 82-90.
- Hamama, A., 1987. Thermonuclease and enterotoxin production and biotyping of staphylococci isolated from Moroccan dairy products. *Le Lait* 67: 403-411.
- Harvey, J., Gilmour, A., 1988. Isolation and characterization of staphylococci from goats milk produced in Northern Ireland. *Lett. Appl. Microbiol.*, 7(4) 79-82.
- Kıvanç, M., Kunduhoğlu, B., Ayaz, B., 1992. Eskişehir'de tüketilen çiğ sütlerin bakteriyolojik kalitesinin halk sağlığı yönünden incelenmesi. *Gıda.* 17(5) 327-333.
- Kielwein, O., 1977. The comparison of the aerobic gram-negative flora in delivered milk and relation to dairy products. *Alimenta.* 16: 41-48.
- Küplülü, Ö., Sarımehtemetoğlu, B., Kaymaz, Ş., 2002. Pastörize sütlerde ELISA tekniği ile stafilocokkal enterotoksin varlığının belirlenmesi. *Türk J. Anim. Sci.* 26: 631-637.
- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C., Hoepflich, P.D., 1971. Metachromic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21: 585-587.
- Lopes, C.A.M., Moreno, G., Curi, P.R., 1990. Antimicrobial susceptibility of *S. aureus* isolated from animal and human sources in Brazil. *Br. Vet. J.*, 146, 50.
- Müller, R., 1975. Untersuchungen über die Antibiotikaresistenz von Mastitisserregern. Doktora tezi, Zürich.
- Müller, C., 1993. Charakterisierung von Staphylokokken aus Mastitismilchproben der Region Nordostschweiz. Doktora tezi, Zürich.
- Ombui, J.N., Arimi, S.M., Kayihura, M., 1992. Raw milk as a source of enterotoxigenic *S. aureus* and enterotoxins in consumer milk. *East Afr. Med. J.*, 69(3) 123-125.
- Otsuka, G., Umeki, F., Seki, M., Yoshida, M., Tekeishi, M., 1992. Evaluation of biological character and pathogenicity of *S. aureus* isolated from bovine quarter milk. *Milchwissenschaft.* 47(7) 423-426.
- Rose, S., Bankes, P., Stringer, M., 1989. Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reserved passive latex agglutination kit. *Int. Food Microbiol.*, 8: 65-72.

- Sancak, Y.C., Alişarlı, M., Akkaya, L., 2002. Otlu peynirlerde enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşları ve enterotoksin varlığı üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniv. Sağlık Bil. Derg. (Baskıda).
- Santos, E.C., Genigeorgis, C., Frauer, T.B., 1981. Prevalence of *S. aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. J. Food Prot. 44: 172-176.
- Sarımehtemoğlu, B., Küplülü, Ö., Çelik, T.H., Akgün, S., Özalp, E., 1996. Ankara'da tüketime sunulan pastörize sütlerin hijyen indeksi bazı mikroorganizmalar yönünden incelenmesi. Gıda. 21(6) 443-449.
- Schalm, O.W., Carrol, E.J., Jain, N.C., 1971. Bovine Mastitis. Lea Febiger, Philadelphia.
- Schlendest, R., Kielwein, G., 1994. Die Häufigkeit des Vorkommens von potentiellen Enterotoxinbildnern von im Rahmen des EGD isolierten Kulturen von *Staphylococcus aureus*. Milchwissenschaft. 50(1) 51-52.
- Seikh, M.I., Luedecke, L.O., 1974. *S. aureus* in commercially processed fluid dairy and non-dairy products. J. Milk Food Technol. 37(6) 329-332.
- Sinell, H.J., 1978. Praktische Erfahrung bei der Selektivzüchtung von Stafilokokken aus Lebensmitteln. Arch. für Lebensmittelhyg., 29: 136.
- Tatini, S.R., Cords, B.R., Gramoli, J., 1976. Screening for staphylococcal enterotoxins in food, Food Technol. 30: 64-73.
- Terplan, G., Zaadhof, K.J., 1978. Nachweisverfahren für *S. aureus* in Lebensmitteln. Arch. für Lebensmittelhyg. 29: 132-135.
- Umoh, V.J., Adesiyun, A.A., Comwalk, N.E., 1990. Enterotoxigenicity of staphylococci isolated from raw milj obtained from settled and nomadic herds around Zaria, Nigeria. Rev. D'elevage et de Med. Vet. Des Pays Tropicaux. 43(1) 43-47.
- White, F., Rattray, E.A.S., Davidson, D.J.G., 1963. Sensivity to antibiotics and biochemical activites of serotypes of bovine staphylococci. J. Comp. Pathol., 73: 21-26.
- Wieneke, A.A., Roberts, D., Gilberts, R.J., 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. Epidemiol. Infect. 110: 519-531.