



Nevşehir İlindeki Kesimhanelerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Moleküler Tiplendirilmesi ve Vankomisin Dirençliliğinin İncelenmesi

Ömer Tolga YILMAZ¹, Harun HIZLISOY²

¹Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Harun HIZLISOY; E-posta: hizlisoy@erciyes.edu.tr; ORCID: 0000-0003-3391-0185

Atıf yapmak için: Yılmaz ÖT, Hızlısoy H. Nevşehir ilindeki kesimhanelerden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının moleküler tiplendirilmesi ve vankomisin dirençliliğinin incelenmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 227-234.

Özet: Bu çalışma, kesimhanelerde *Staphylococcus aureus*'un mevcudiyetini, izolatların moleküler tiplendirmesini ve izolatların vankomisin antibiyotiğine duyarlılığını tespit etmeyi amaçlamaktadır. Nevşehir ilindeki üç farklı kesimhane-den sıvap ile alınan; sığır karkası, duvar, bıçak, kesme tahtası yüzeyleri ve kesimhane atık su örnekleri çalışma kapsamında materyal olarak kullanılmıştır. Her bir kesimhaneden; 10 adet sığır karkası yüzeyi, 10 adet duvar yüzeyi, 10 adet bıçak yüzeyi, 10 adet kesme tahtası yüzeyi ve 10 adet atık su olmak üzere, bir kesimhaneden toplam 50 adet; üç kesimhaneden toplam 150 adet numune incelenmiştir. Etken izolasyonunu takiben izolatların identifikasyonu fenotipik ve moleküler yöntemlerle (PCR) yapılmıştır. İzolatların vankomisine duyarlılıkları E test ile test edilmiştir. Ayrıca izolatların genetik yakınlıkları Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) ile araştırılmıştır. Çalışmada 150 örnekten 150 izolat elde edilmiş, bu izolatların 65'i (%43.3) fenotipik olarak koagülaz pozitif stafilocok olarak tespit edilmiştir. Bu 65 izolatın 6'sı (%4) ise PCR sonucu *S. aureus* olarak identifiye edilmiştir. Elde edilen *S. aureus* izolatlarının tümünün (duyarlı: ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$) vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. ERIC-PCR analizi sonucu izolatların genotipik olarak farklı olduğu saptanmıştır. Hem gıda toksikasyonlarının önüne geçmek hem de karkas kalitesini artırmak ve kırmızı etin raf ömrünü uzatmak için, kesimhanede hijyen koşullarına dikkat edilmelidir. Yapılan antibiyotik duyarlılık test sonucu, direnç tespit edilmemesi olumlu olmakla birlikte, antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımından kaçınılmalı ve kullanımları kontrol altında tutulmalıdır.

Anahtar kelimeler: E test, halk sağlığı, kesimhane, vankomisin, VRSA

Molecular Typing of *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained from Slaughterhouses in Nevşehir Province (Turkey) and Investigation of Vancomycin Resistance of The Isolates

Summary: This study aims to determine the presence of *Staphylococcus aureus* in the slaughter houses, the molecular typing of the isolates and the susceptibility of the isolates to the vancomycin antibiotic. The samples collected from cattle carcass, wall, knife, wastewater and cutting board from three different slaughterhouses in the Province of Nevşehir, in the scope of the study, were used as material. Fifty swab samples of 10 beef carcass surfaces, 10 wall surface, 10 blade surface, 10 cutting board surface and 10 waste water were taken from each slaughterhouse; a total of 150 swab samples were analyzed. The identification of the isolates was performed by phenotypic and molecular methods (PCR) following the isolation of the agents. The susceptibility of the isolates to vancomycin was tested by E test. In addition, genetic proximity of the isolates was investigated by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR). In this study, 150 isolates were obtained from 150 samples. 65 (43.3%) of these isolates were identified as coagulase positive staphylococci and 6 (4%) of 150 isolates were identified as *S. aureus*. All *S. aureus* isolates (susceptible: ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$; moderately sensitive: 4-8 $\mu\text{g/ml}$; resistant: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) were found to be susceptible to vancomycin. According to the ERIC-PCR analysis, isolates have been determined to be genotypically different. Special attention should be paid to hygiene conditions in slaughterhouses, both to prevent food poisoning and to improve carcass quality, and to extend the shelf life of red meat. Although it is pleasing that no resistance is detected as a result of our antimicrobial susceptibility test; unconscious use of antibiotics should be avoided, and their use should be kept under control.

Key words: E Test, public health, slaughterhouse, vancomycine, VRSA

Giriş

Stafilokoklar, toplum sağlığı açısından önemli pato-

jenlerdir. *Staphylococcus aureus* insanlarda normal biotada bulunmakla birlikte, sağlığı olumsuz yönde etkileyen; endokardit, bakteriyemi ve gıda kaynaklı intoksikasyonların önde gelen nedenlerindendir (Hızlısoy ve ark., 2018). *S. aureus*, insanların % 30'unun mukozalarında bulunurken, bu oranın gıda sektöründe çalışanlarda %26-39.9 arasında olduğu

Geliş Tarihi/Submission Date : 03.09.2019

Kabul Tarihi/Accepted Date : 18.02.2020

*Bu araştırma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL-2018-7812 nolu Yüksek Lisans Tez projesinden türetilmiştir.

ve bunların da %8-17.4'ünün enterotoksijenik *S. aureus* suşları olduğu belirtilmiştir (Tong ve ark., 2015). Ayrıca, personel hijyeninin değerlendirilmesinde gıdalardaki *S. aureus* kontaminasyonu, indikatör olarak kullanılmaktadır (Yıldırım ve ark., 2017). Çiftlik hayvanlarında yoğun olarak antibiyotik kullanımı, karkas ve sakadatlarda kalıntıya ve mikroorganizmaların kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olmaktadır (Gomez-Gil ve ark., 2000). Antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmalar gıdalarda da bulunmakta ve bu gıdaların tüketimi sırasında vücuda alınabilmektedir. Bunun sonucu olarak, vücuda giren dirençli mikroorganizmalar insanlarda sağaltımı zor enfeksiyonlara neden olmakta ve toplum sağlığını tehdit etmektedir (Terzi ve ark., 2015). Penisilin dirençli *S. aureus*'un tedavisi için, 1959 yılında metisilin geliştirilmiş olmasına karşılık; kısa süre içerisinde *S. aureus* metisiline karşı da direnç geliştirmiş ve 1961 yılına gelindiğinde laboratuvar suşunda direnç kaydedilmiştir (Barber, 1961). Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde başarı, trisiklik bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin ile sağlanmış ve vankomisin bu tür enfeksiyonların tedavisinde tercih sebebi olmuştur (Sorrell ve ark., 1982). Vankomisinin tekrarlayan ve uzun süre kullanımları sonucu dirençli suşlar gelişmeye başlamıştır (Gardete ve Tomasz, 2014). Bunun sonucunda, önemli bir patojen etken olan, vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), ilk kez 1989 yılında Birleşik Devletler'de bildirilmiştir. İlerleyen zamanlarda ise sırasıyla 1996 yılında Japonya'da, 1997 yılında ise Birleşik Devletler'de vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus* (VISA) suşları kayda geçmiştir (Sancak, 2011). VISA, tüm dünyada tanımlanan MRSA izolatları arasında artan sıklıkta bildirilmeye başlanmıştır (Howden ve ark., 2010). MİK değerlerindeki ılımlı artışlarına rağmen, VISA enfeksiyonlarının vankomisin ile tedavisi tedavisi sıklıkla başarısızlıkla son bulmuştur (Gardete ve Tomasz, 2014). Son yıllarda, stafilokokların antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin hızla arttığı belirlenmiş ve yapılan güncel çalışmalarda da gıdalarda bulunan *S. aureus*'un antibiyotik direnç yönünden analizleri önem kazanmıştır (Fijalkowski ve ark., 2016).

Et ve et ürünleri vasıtasıyla yayılabilecek dirençli suşların tespiti ve takibi açısından yapılan bu çalışmada, Nevşehir'de bulunan üç adet kesimhaneden örnekler alınarak, *S. aureus* mevcudiyetinin belirlenmesi, elde edilen izolatlarda vankomisin direncinin saptanması ve bu izolatların moleküler tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Karkas ve kesimhane örnekleri

Bu çalışmada; Ekim-Kasım 2018 tarihleri arasında, Nevşehir ilinde bulunan, üç adet, büyükbaş kesimhanelerinin her birinden 50 adet (10 adet kesim tahtası

yüzeyi, 10 adet bıçak yüzeyi, 10 adet duvar yüzeyi, 10 adet karkas yüzeyi ve 10 adet kesimhane atık suyu), toplamda 150 adet sıvap numunesi alındı. Numuneler; karkaslardan, kesme tahtaları yüzeylerinden ve duvar yüzeylerinden 10X10 cm boyutunda steril metal çerçeve kullanılarak alındı. Numuneler metal çerçevenin içerisinde, 10 kez yukarı aşağıya ve 10 kez de bir kenardan diğerine olacak şekilde alındı (Ertaş Onmaz ve Datlı, 2018). Diğer numuneler ise bıçakların sadece karkasla temas eden metal yüzeyinden ve kesim esnasında akmakta olan atık suya sıvabın daldırılıp çıkarılmasıyla toplandı. Alınan numuneler *S. aureus* varlığı yönünden materyal olarak kullanıldı. Örnekler steril bir şekilde 24 saat içerisinde soğuk zincirde Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Laboratuvarı'na getirilerek incelemeye alındı.

Standart suş

Çalışmada, izolasyon, identifikasyon aşamaları ve antibiyotik duyarlılık testi için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 referans suşu kullanıldı.

S. aureus'un izolasyon ve identifikasyonu

İzolasyon amacıyla sıvaplar *S. aureus* için selektif besiyeri olan Egg Yolk Tellüritli Baird Parker agar (Oxoid, İngiltere) (ISO 6888) besiyerine inoküle edildi ve 24-48 saat aerobik koşullarda 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda Baird Parker agar üzerinde siyah koloni etrafında parlak zon oluşturan koloniler seçilerek kanlı agara (Oxoid, İngiltere) inoküle edildi ve 24-48 saat aerobik koşullarda 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonucu gelişen koloniler, fenotipik identifikasyon testlerine (Gram boyama, oksidaz testi, katalaz testi, beta hemoliz testi, koagülaz testi) tabi tutuldu. *S. aureus* yönünden pozitif bulunan izolatlar, sonraki testlerde incelenmek amacıyla %10 gliserinli (Merck, Almanya) Brucella Broth (Oxoid, İngiltere) sıvı besiyeri içeren kriyotüplerde -20°C'deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

DNA ekstraksiyonu

Bakteri DNA'sını elde etmek için InstaGene Matrix (Bio-Rad, ABD) ekstraksiyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi için kit protokolünde yer alan direktiflere bağlı kalındı. Kısaca, fenotipik olarak doğrulanan izolatlara ait 24 saatlik sıvı kültürden endorflara yaklaşık 1 mL alındıktan sonra 12.000xrp'm'de 1 dakika santrifüj edildi. Ependorfun üstünde biriken sıvı pipet yardımıyla uzaklaştırılarak altta kalan pelletin üzerine 200 µL InstaGene Matrix solüsyonundan eklenerek vorteks ile (Velp, İtalya) homojenize edildi ve 56° C'de 15-30 dk. inkübe edildi. Daha sonra bu süspansiyon 10 sn. boyunca yüksek hızda vortekslenerek homojenize edilen süspansiyon 100° C'lik su banyosunda 8 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12.000x rpm'de 2-3 dk süreyle santrifüj edildi. Bu sürenin sonunda elde edilen süpernatandan 20 µL

alınarak PCR reaksiyonlarında template DNA olarak kullanılmak üzere -20° C'de saklandı.

Moleküler identifikasyon

Karkas ve kesimhane materyallerinden izole edilen ve fenotipik testlerle *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların PCR ile moleküler olarak teyidi yapıldı. PCR analizinde, *S. aureus*'un termostabil nükleazını kodlayan *nuc* geninin amplifikasyonu için *nuc*-F166 ve *nuc*-R565 primerleri kullanıldı (Tablo 1) (Crago ve ark., 2010). PCR reaksiyonu toplam 25 µL hacimde gerçekleştirildi. Reaksiyon bileşimi; her bir primerden 0.2 µM, 200 µM dNTP, 2.5 µL PCR reaksiyon buffer, 3mM MgCl₂, 2 U Taq DNA polimeraz (ThermoScientific, ABD) ve 1 µL örnek DNA'sından oluşturuldu. Termal döngü; 94° C'de 5 dk ilk denatürasyonu takiben; 30 siklustan oluşan 94° C'de 10 sn denatürasyon, 59° C'de 20 sn primer bağlanması, 72° C'de 10 sn. uzama ve daha sonra tek siklustan oluşan 72° C'de 5 dk. son uzama şeklinde gerçekleştirildi.

kanlı Mueller Hinton Agar'da aerobik ortamda 18-24 saat inkübasyon sonucu üretildi. Oluşan bakteri kolonileri besiyeri üzerinden toplanarak %0.075 NaCl içinde süspansiyon edildi ve bakteri yoğunluğu McFarland No:0.5 (1.5 x 10⁸ CFU/mL) standardına göre ayarlandı. Yoğunluğu ayarlanan bakteri süspansiyonundan Mueller Hinton agar besiyerine 0.1 mL ekim yapıldı ve steril bağıt ile yayıldı. Takiben E test kartuşları bakteri ekilen bu besiyeri üzerine yerleştirildi. Besiyerleri aerobik ortamda 37° C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ekim alanında oluşan eliptik inhibisyon zonlarının keşiştiği nokta MİK değeri olarak kabul edildi ve izolatların duyarlı, orta duyarlı ve dirençlilik durumları CLSI kriterlerine göre değerlendirildi (CLSI, 2017).

İstatistiksel analiz

Çalışmanın istatistiksel analizinde kesimhanelerdeki *S. aureus* varlığı ile duvar, bıçak, atık su, tahta ve karkaslardan alınan sıvı örneklerini karşılaştırmak amacıyla "ki-kare testi" uygulandı. Ki-kare testi için SPSS (Windows için Sosyal Bilimler için İstatistik

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükler

Primer	Primer Dizilimi (5'--3')	Gen Bölgesi	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
NUC-F166	AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA	<i>nuc</i>	400	Dongyou, (2010)
NUC-R565	TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT			
ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC	-	-	Ye ve ark. (2012)
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	-	-	

Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR ile moleküler tiplendirme

S. aureus izolatlarının moleküler tiplendirilmesi amacıyla ERIC-PCR ile yapıldı ve testte ERIC-1(5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC-3') ve ERIC-2(5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') primerleri kullanıldı (Ye ve ark., 2012). PCR bileşimi, 5 µL 10xPCR buffer A, 4 mM MgCl₂, 5 U Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, ABD), 0.2 mM dNTP miks, 25 pmol her bir primerden ve 1 µL örnek DNA'sını içeren toplam 50 µL hacimde oluşturuldu. Amplifikasyon; 94° C'de 5 dk. ilk denatürasyonu takiben 40 siklustan oluşan 94° C'de 1 dk. denatürasyon, 25° C'de 1 dk. primer bağlanması ve 72° C'de 2 dk. uzama şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerin, %2'lik agaroz jelde elektroforezi yapılmış ve oluşan bantlar jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, Fransa) incelenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi

E Test: *S. aureus* izolatlarının vankomisin duyarlılığı E test stripleri (MA0102, Oxoid, İngiltere) eşliğinde gerçekleştirildi ve MİK düzeyi ve MİK aralığı tespit edildi. Bunun için; *S. aureus* izolatları %5 defibrine koyun

Paketi) 23.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanıldı.

Bulgular

S. aureus izolasyon sonuçları

Bu çalışmada Nevşehir ilinde bulunan üç ayrı kesimhanelerden toplanan 150 adet numune, *S. aureus* yönünden incelendi. Toplanan 150 numuneden 150 adet izolat elde edildi. Elde edilen 150 izolatın; 65'i (%43.3) koagülaz pozitif stafilokok, bu 65 izolatın 6'sı (%4) da *S. aureus* olarak tanımlandı.

S. aureus'un PCR ile tespiti

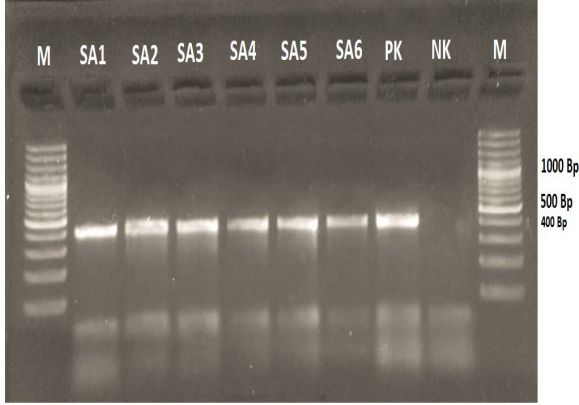
S. aureus'un "*nuc*" geninin amplifikasyonunun hedeflendiği tür spesifik PCR'de 400 bp bant büyüklüğündeki amplifiye ürünler pozitif kabul edildi. Bu yöntemle, fenotipik olarak *S. aureus* şeklinde tanımlanan 6 (%4) izolatın tamamı, PCR ile *S. aureus* olarak doğrulandı. *S. aureus* pozitifliği 1 nolu kesimhanede (2 atık su örneği ve 1 kesme tahtası yüzey örneğinden), 2 nolu kesimhanede (2 duvar yüzeyi ve 1 karkas yüzeyinden) elde edilirken, 3 nolu kesimhanede pozitif izolat tespit edilemedi. Çalışmada kesimhanelerdeki

duvar, bıçak, atık su, tahta ve karkaslardan alınan sıvı örneklerinde ve kesimhanelerdeki *S. aureus* izolasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

sonucunda izolatların 5 ile 14 arasında bant vererek farklı profiller sergilediği görüldü. Bu sonuca göre, izolatların tamamının birbirinden farklı olduğu tespit edildi.

Tablo 2. Kesimhane bazlı *S. aureus* izolasyon ve identifikasyon bulguları

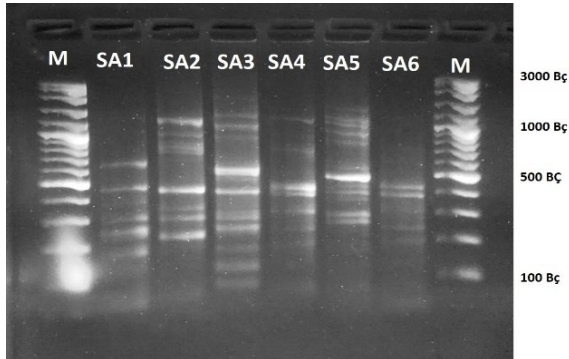
Örnek	Kesimhane 1 n=50	Kesimhane 2 n=50	Kesimhane 3 n=50	Yüzde %
Kesim tahtası yüzeyi (T) (n=30)	SA1	-	-	%3.3
Bıçak yüzeyi (B) (n=30)	-	-	-	-
Duvar yüzeyi (D) (n=30)	-	SA4-SA5	-	%6.6
Karkas yüzeyi (K) (n=30)	-	SA6	-	%3.3
Kesimhane Atık Suyu (S) (n=30)	SA2-SA3	-	-	%6.6
Toplam	3	3	-	%4.0



Şekil 1. Tür-spesifik PCR'ye ait amplifiye ürünlerin % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 400 bp'lik amplifiye ürünler *S. aureus* spesifiktir. PK: Pozitif Kontrol (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), NK: Negatif Kontrol (Distile su), M: Marker (SM0321, Generuler, 100Bp plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, ABD), SA1-6: *S. aureus* izolatları

ERIC-PCR sonuçları

S. aureus izolatları üzerine uygulanan ERIC-PCR



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarının %2'lik agaroz jeldeki ERIC-PCR paternleri. M: Marker (SM0321, Generuler, 100Bp plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, ABD), SA1-6: *S. aureus* izolatları

Antibiyotik duyarlılık testi

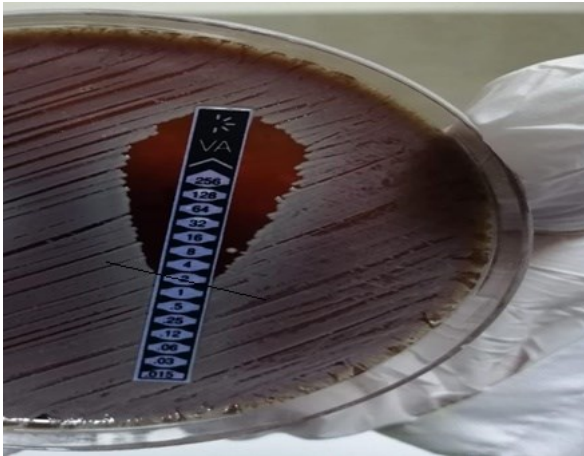
E Test sonuçları: Vankomisin, *Staphylococcus aureus* izolatlarına özgü MİK düzeylerini belirlemek amacıyla uygulanan E test sonucunda, tüm izolatlar CLSI kriterlerine göre (duyarlı: ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$; orta duyarlı: 4-8 $\mu\text{g/ml}$; dirençli: ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. Buna göre MİK düzeyleri iki izolat için 0.5 $\mu\text{g/ml}$, bir izolatta 1 $\mu\text{g/ml}$, üç izolatta ise 2 $\mu\text{g/ml}$ şeklinde bulunmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Stafilokoklar toplum sağlığı açısından son derece önemli patojen mikroorganizma grubunu oluşturmaktadır. *S. aureus*, insanlarda normal biyotada bulunmakla birlikte, sağlığı olumsuz yönde etkileyen; endokardit, bakteriyemi ve gıda kaynaklı intoksikasyonların önde gelen sebeplerinden birisi olarak tespit edilmiştir (Hızlısoy ve ark., 2018). Aynı zamanda *S. aureus*, birçok ülkede resmi kayıtlara göre gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonların üçüncü en yaygın sorumlusu olarak belirtilmiştir (Veras ve ark., 2008). Stafilocokal gıda zehirlenmesi, enterotoksijenik stafilocokların besinlerde 10⁶ kob/g seviyesinin üzerinde olması ve ürettikleri enterotoksinlerin sindirim yoluyla alınmasını takiben şekillenmektedir. Bunun yanı sıra, stafilocokal enterotoksinler (SE) artrit, alerjik reaksiyonlara, toksik şok benzeri sendroma ve otoimmün hastalıklara neden olmaktadır (Cha ve ark., 2006). Çeşitli çalışmalarda değişik kaynaklardan ayrılan *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %15-80'inin SE üretebildiği bildirilmiştir. Stafilocokal enterotoksin A (SEA), en sık stafilocokal gıda kaynaklı salgınlarla ilişkili enterotoksindir ve bunu stafilocokal enterotoksin (SED) takip etmektedir (Yıldırım ve ark., 2019). Kesim işlemi esnasında karkas, hayvanların derilerindeki ve sindirim sistemindeki *S. aureus*'la kolaylıkla kontamine olabilmektedir. Ayrıca personelin hijyen noksanlığı da karkası kontamine edebilmektedir (Keyvan, 2014). Bu çalışmada alınan örneklerden 65'inde (%43.3) koagülaz pozitif stafilocok tespit edilmiştir. Sığır karkaslarından koagülaz pozitif stafilocok mevcudiyeti yönünde daha önce yapılan çalışmalardan farklı seviyelerde sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 3. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları (CLSI, 2017)
(S: Duyarlı I: Orta duyarlı R: Dirençli MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon)

VAN-KOMİ SIN	S	I	R	Örnek	MİK (µg/mL)
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA1	0.5 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA2	2 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA3	2 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA4	1 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA5	0.5 S
	≤ 2	4-8	≥ 16	SA6	2 S



Şekil 3. *S. aureus* izolatının vankomisin duyarlılığının E test ile saptanması (İzolatin eliptik inhibisyon zonlarının keşiştiği nokta (MİK değeri) ≤2 µL/mL)

Keyvan ve Özdemir (2016), Ankara'da yaptıkları çalışma neticesinde, toplam 120 sığır karkasından sünger sıvap yöntemi ile alınan örneklerin 32'sinde (% 26.6) koagülaz pozitif stafilocok bulunduğunu belirtmişlerdir. Özdemir ve ark. (2010), tarafından yapılan bir diğer çalışmada 120 sığır karkasından toplanan örneklerin 46'sının (%38.3) koagülaz pozitif stafilocok yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen izolasyon oranının, daha önce yapılan çalışmalarda saptanan oranlara nazaran yüksek olduğu görülmekte olup; bu durumun çalışma alanının kontaminasyonunun daha fazla olmasından kaynaklanabileceği şeklinde düşünülmektedir. Bu çalışmadaki izolasyon oranlarına benzer veya daha yüksek oranlar da bildirilmiştir. Beyene ve ark. (2017), tarafından yapılan bir çalışmada ise materyal olarak kesimhanede kullanılan bıçak, kesim hattı ekipmanları ve karkas yüzeyi sıvap örnekleri toplamış, yapılan analizlerde %43.47 düzeyinde koagülaz pozitif stafilocok bulunduğu tespit edilmiştir. Desmarchelier ve ark. (1999), üç farklı kesimhaneden topladıkları sığır karkaslarında sırasıyla %62, %85 ve %89 düzeylerinde koagülaz pozitif stafilocok tespit etmişlerdir. Araştırmanın bulguları, birinci kesimhane hariç, bu çalışmadaki izolasyon oranına göre oldukça yüksek saptanmıştır. Bu durumun kontaminasyonunun fazla olmasın-

dan kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca, kesimhanelerin fiziki yapı farklılıkları, kesilen hayvan türü, örneklem alanları, örnekleme materyalleri, örnekleme tarzları ve hatta kültürel işlem/besiyeride etken yaygınlığındaki farklılıkların diğer olası nedenleri olabilir.

Bu çalışmada izole edilen koagülaz pozitif stafilocokların fenotipik ve moleküler testleri sonucunda izolatların 6'sı (%4.0) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Kesimhanelerde *S. aureus* tespitine yönelik birçok çalışma bildirilmiştir.

Keyvan ve Özdemir (2016) çalışmalarında, toplam 120 sığır karkasından sünger sıvap yöntemi ile alınan örneklerin 15'inde (%12.5) *S. aureus* tespit etmişlerdir. Yılmaz ve Gümüş (2004) tarafından yapılan çalışmada, kesimhaneden alınan 150 karkas sıvap örneği incelenmiş ve %30 oranında *S. aureus* saptanmıştır. Türkiye'de yapılan bu çalışmalarda tespit edilen *S. aureus* oranlarının, bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında, yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni olarak; numune alma yöntemindeki ve kesimhane şartlarındaki farklılıklar, kesim öncesi hayvanların derilerindeki mikrobiyal yükün fazlalığı ve bunun kesim esnasında karkasa bulaşma olasılığı kaynaklı olabileceği şeklinde düşünülmektedir. Tanih ve ark. (2015) tarafından Güney Afrika'da üç farklı kesimhaneden kesilen sığır karkaslarından alınan 112 adet sıvap örneği fenotipik olarak incelenmiş ve bunların 30'u (%26.7) *S. aureus* yönünden pozitif bulunmuştur. Adugna ve ark. (2018), Etiyopya'da bir kesimhanede kullanılan kesme tahtası ve bıçak yüzeyi sıvap örneklerinden (40'ar adet) sırasıyla 6 (%15.0) ve 9 (%22.5) *S. aureus* tanımlanmıştır. Bersisa ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 16'şar karkas yüzeyi, kesme tahtası yüzeyi ve bıçak yüzeyi sıvap örneklerinden sırasıyla, 4'ü (%25), 7'si (%43.75) ve 5'i (%31.25) *S. aureus* yönünden pozitif olarak bildirilmiş ve karkas yıkama suyundan aldıkları örneklerde yapılan çalışmada *S. aureus*'a rastlanmadığı belirtilmiştir. Gowda Tanuja ve ark. (2017), 4 farklı kesimhaneden aldıkları, sığır karkas yüzeyi (152), bıçak yüzeyi (109), kesme tahtası yüzeyi (104) sıvap örneklerinin analizi sonucunda, sırasıyla %59.9, %51.4 ve %50 düzeylerinde *S. aureus* bulunduğunu aktarmışlardır. Beyene ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada %13.9 oranında *S. aureus* tespit edilmiştir. Birhanu ve ark. (2017) tarafından Etiyopya'da yapılan çalışmada materyal olarak kes-

me tahtası yüzeyi ve bıçak yüzeyi kullanılmış, her birinden 53 adet sıvap örneği alınmış ve sırasıyla 5'inde (%9.43) ve 2'sinde (%3.77) *S. aureus*, tespit edilmiştir. Bıçak yüzeyinden alınan örneklerde tespit edilen oran bu çalışmada saptanan oranla hemen hemen benzerlik göstermektedir. Literatür taraması sonucunda, sığır karkaslarında *S. aureus* oranları bakımından karşılaştırma yapıldığında, bu çalışmadaki oran diğerlerine nazaran düşük saptanmıştır. Bir numaralı kesimhanede; kesim tahtası yüzeyi ve kesimhaneye atık suyunda, iki numaralı kesimhanede ise duvar yüzeyi ve karkas yüzeyinde *S. aureus* tespit edilmiştir. İki numaralı kesimhanede kontaminasyonun duvar ve karkas yüzeyinde olması, duvarlar yüzeylerinin hijyenini sağlamada kesimhaneye sanitasyon prosedürlerinin tam olarak yerine getirilmemesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *S. aureus*'un, özellikle insanların normal biotalarında bulunduğu bilinmektedir. Bu oranlar analiz edildiğinde, çalışanların hijyen konusundaki eksiklikleri, karkası ve ekipmanları kontamine ettiği düşünülebilir. Ayrıca, bu sonuçlar, örneklerin alındığı üç kesimhanedeki hijyen prosedürlerinin daha iyi işletildiği anlamına da gelebilir.

Bu çalışmada *S. aureus* izolatlarının vankomisin duyarlılığı E test yöntemi ile test edilmiş ve tüm izolatların vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır (duyarlı: ?2 µg/ml). *S. aureus*'un vankomisin duyarlılığının araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur.

Aydın ve ark. (2011), Tanih ve ark. (2015) ve Keyvan ve Özdemir (2016) tarafından yapılan çalışmalarda, elde edilen *S. aureus* izolatlarına uygulanan antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda, tüm izolatlar vankomisine duyarlı bulunmuştur. Tüm bu çalışmalarda *S. aureus* izolatlarının vankomisine duyarlılığı konusunda saptanan bulgular bu çalışmadaki bulgularla benzerlik göstermektedir. Türkiye'de ve dünya genelinde yapılan vankomisin duyarlılık testi sonuçları incelendiğinde, direnç tespiti olmamasının, dünya genelinde vankomisinin veteriner sahadaki kullanım kısıtlılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Şahal, 2012). Buna karşılık, vankomisine karşı direnç tespit edilen çalışmalar da mevcuttur. Adugna ve ark. (2018), %54.5 vancomycin intermediate resistance *Staphylococcus aureus* (VIRSA) ve %45.5 vancomycin resistance *Staphylococcus aureus* (VRSA), Gowda Tanuja ve ark. (2017), %78 Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus* (VSSA), %14 VIRSA ve %8 VRSA, Beyene ve ark. (2017) %65.1 oranında VRSA tespit etmişlerdir.

ERIC-PCR ile *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların moleküler tiplendirilmesi sonucu izolatların 5 ile 14 arasında bant vererek farklı profiller sergilediği ve izolatların tamamının birbirinden farklı olduğu tespit edildi. Pozitif olarak tespit edilen *S. aureus* izolatları arasında klonal bir yakınlığın bulunmaması ile mezbanın farklı kısımlarından izole edilen izolatların,

çapraz kontaminasyon kaynaklı olmadığı ve bir salgın suşunun bulunmadığı sonucuna varılmıştır. *S. aureus* izolatlarının ERIC-PCR ile tiplendirildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bunlardan Abdollahi ve ark. (2014)'nın bildirdikleri çalışmada 90 *S. aureus* izolatının tiplendirilmesi yapılmıştır. Adwan ve ark. (2015)'in çalışmalarında ERIC-PCR ile SCC mec ve spa tiplendirme birlikte kullanılmıştır. Arslan ve Mutlu (2016)'nın çalışmalarında sığır mastitis olgularından izole edilen 98 *S. aureus* izolatlarının ERIC-PCR ile tiplendirilmesi yapılmış ve 64 farklı ERIC genotipinin bulunduğu ifade edilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada, kültürel yöntemlerle izole edilen 65 (%43.3) koagülaz pozitif stafilokokun fenotipik ve PCR temelli moleküler yöntemlerle yapılan analizinde 6'sı (%4) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* izolatlarının vankomisin duyarlılığı E test stripleri ile analiz edilmiş ve izolatların tamamının vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır (? 2 µg/ml). ERIC-PCR ile yapılan genotiplendirme sonucu altı izolatın hepsinin farklı profil gösterdiği ve böylelikle birbirlerinden farklı genotipe sahip izolatlar oldukları ortaya konulmuştur.

İnsanların ve hayvanların doğal biotasında bulunan *S. aureus*, hijyen eksikliğinin ortaya konmasında gıdalarda indikatör bir role sahiptir. İnsan beslenmesinde önemli bir yer tutan kırmızı etin ilk işlendiği yer olan kesimhanelerde mikroorganizma yükünün minimal düzeyde tutulması gereklidir. Yapılan antibiyotik duyarlılık testi neticesinde vankomisin *S. aureus*'lar için hala etkili olduğu ortaya konmuştur. Antibiyotik kullanımının sınırlandırılması konusunda WHO tarafından, farkındalığı artırmaya yönelik çalışmalara hız verilmiş durumdadır. Bu durum hayvanların ve insanların maruz kaldığı gereksiz antibiyotik uygulamalarının önüne geçilmesini amaçlamaktadır. Hayvan hastalıklarının önlenmesi, dolayısı ile sağlıklı ve kaliteli içermeyen kırmızı etin tüketiciye ulaşmasındaki altın kural ise koruyucu hekimliktir. Kesimhanelerde hijyen prosedürlerine yüksek bağlılık ve antibiyotik kullanımında hekim, eczacı ve hayvan sahiplerinin duyarlı davranmaları, özellikle veteriner hekimlikte reçetesiz antibiyotik verilmemesi ve bu şekilde antibiyotik talep edilmemesi önem arz etmektedir.

Teşekkür

TYL-2018-7812 kodlu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Adugna F, Pal M, Girmay G. Prevalence and antibiogram assessment of *Staphylococcus aureus* in beef at municipal abattoir and but chers hops in Addis Ababa, Ethiopia. Biomed Res Int 2018: 1-7.

- Abdollahi S, Ramazanzadeh R, Kalantar E, Zamani S. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* with ERIC-PCR method. *Bull Env Pharmacol Life Sci* 2014; 3(3): 158-65.
- Adwan G, Shaheen H, Adwan K, Barakat A. Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals environments and patients in Northern Palestine. *Epidemiol Biostat Public Health* 2015;12(3): e11183.
- Arslan E, Mutlu EG. Genotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey by using ERIC-PCR method. *Pakistan J Zool* 2016; 48(6): 1747-52.
- Aydin A, Muratoglu K, Sudagidan M, Bostan K, Okulu B, Harsa S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8(1): 63-9.
- Barber M. Methicillin-resistant *Staphylococci*. *J Clin Path* 1961; 14: 385-92.
- Bersisa A, Tulu D, Negera, C. Investigation of bacteriological quality of meat from abattoir and butcher shops in Bishoftu, Central Ethiopia. *Int J Food Microbiol* 2019: 1-8.
- Beyene T, Hayishe H, Gizaw F, Beyi AF, Abunna F, Mammo B, Ayana D, Walktole H, Abdi RD. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Research Notes* 2017; 10(1): 171.
- Birhanu W, Weldegebriel S, Bassazin G, Mitku F, Birku L, Tadesse M, Assesment of microbiological quality and meat handling practices in butcher shops and abattoir found in Gondar town, Ethiopia. *Int J Microbiol Res* 2017; 8(2): 59-68.
- Crago B, Ferrato, C, Drews SJ, Svenson LW, Tyrrell G, Louie M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with food borne illness in Alberta, Canada from 2007. *Food Microbiol* 2010; 32(1): 202-5.
- Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J Appl Microbiol* 2006; 101(4): 864-71.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Seventh Edition. (CLSI supplement M100 Clinicaland Laboratory Standards Institute), Wayne. Pennsylvania, USA, 2017: 56-63.
- Desmarchelier PM, Higgs GM, Mills L, Sullivan AM, Vanderlinde PB. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australia abattoirs. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 222-9.
- Dongyou L. *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. First Edition. Boca Raton: CRC Press, 2010; p. 245-55.
- Ertaş Onmaz N, Datlı S. Bir büyükbaş hayvan kesimhanesinde *Escherichia coli* O157:H7 varlığının IMS-PZR teknikleri ile araştırılması. *Eurasian J Vet Sci* 2018; 34(1): 49-55.
- Fijalkowski K, Peitler D, Karakulska J. *Staphylococci* isolated from ready-to-eat meat identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. *Int J Food Microbiol* 2016; 238: 113-20.
- Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2014;124 (7): 2836-40.
- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 2000; 191: 259-70.
- Gowda Tanuja KGM, Latha C, Sunil B, Van Damme I. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Listeria* species and *Staphylococcus aureus* in cattle slaughterhouses of Kerala, South India. *Foodborne Pathog Dis* 2017; 14(10): 573-9.
- Hızlısoy H, Ertaş Onmaz N, Karadal F, Al S, Yıldırım Y, Gönülalan Z, Kılıç H. Antibiotic resistance gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from foods of animal origin. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2018; 24(2): 244-9.
- Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 99-139.
- Keyvan E ve Özdemir H. Sığır karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, enterotoksijenik özellikleri ve antimikrobiyal dirençliliği. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 2016; 63(1): 17-23.
- Keyvan E. Sığır Karkaslarında *Staphylococcus aureus*'un varlığı, karakterizasyonu ve antimikrobiyal dirençliliğinin belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ Bil Ens, Ankara, 2014; s. 11-7.
- Özdemir H, Şireli UT, Can HY. Determination of microbial surface contamination on beef carcasses. *Arch Lebensmittelhyg* 2010; 61(1): 27-30.
- Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik di-

- renci. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 568-71.
- Sorrell TC, Packham DR, Shanker S, Foldes M, Munro R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Intern Med 1982; 97(3): 344-50.
- Şahal M. Süt ve besi hayvancılığında antibiyotik kullanımı. Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyel Direnç Sempozyumu. 18 Ekim, 2012; Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ankara-Türkiye.
- Tanih NF, Sekwadi E, Ndip RN, Bessong PO. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from cattle and pigs slaughtered in abattoirs in Vhembe District, South Africa. Sci World J 2015: 1-8.
- Terzi G, Gücükoğlu A, Çadırcı Ö, Uyanık T, Alışarlı M. Serotyping and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eatfoods in Samsun, Turkey. Turk J Vet Anim Sci 2015; 39: 211-7.
- Tong, SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015; 28(3): 603-61.
- Veras, JF, do Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, dos Santos DA, Cerqueira MMOP, Cantini A, Nicoli JR, Jett M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerai Brazil. Int J Infect Dis 2008; 12: 410-5.
- Ye Y, Jiang Q, Wu Q, Zhang J, Lu J, Lin L. The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotics susceptibility testing, enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, and random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. Foodborne Pathog Dis 2012; 9(2): 168-71.
- Yıldırım Y, Ertuş Onmaz N, Gonulalan Z, Al S, Yıldırım A, Karadal F, Hızlısoy H, Pamuk Ş. Microbiological quality of pastrami and associated surfaces at the point of sale in Kayseri Turkey. Public Health 2017; 146: 152-8.
- Yıldırım T, Sadati F, Kocaman B, Siriken B. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxin detection in raw milk and cheese origin coagulase positive isolates. Int J Sci Lett (IJSL) 2019; 1(1): 30-41.
- Yılmaz İ, Gümüş T. Sığır karkaslarının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi, Onuncu Gıda Kongresi. 21-23 Mayıs 2004; Atatürk Üniversitesi, Erzurum-

Türkiye.