



Mezbaha Ortamından İzole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesi ve Biyofilm ile İlişkili Virülans Genlerin Varlığı

Candan GÜNGÖR¹, Dursun Alp GÜNDOĞ¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹

¹ Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 14.04.2023

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 22.05.2023

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2023

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Güngör C, Gündoğ DA, Onmaz NE. Mezbaha Ortamından İzole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesi ve Biyofilm ile İlişkili Virülans Genlerin Varlığı. Bozok Vet Sci (2023) 4, (1):12-17

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ilinde mevcut olan birinci sınıf bir sığır mezbahasında kesim hattı boyunca alınan örneklerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *E. faecalis* varlığı ve izolatlar da biyofilm ile ilişkili virülans faktör genlerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada, kesimhaneden alınan toplam 300 adet örnekte (180 karkas, 48 bıçak, 42 çengel, 6 testere, 6 deri bandı ve 18 mezbaha atık suyu) etkenin varlığı konvansiyonel yöntem ve PZR ile analiz edildi. İzolatların biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemede Kongo kırmızısı agar ve mikroplaka testi ve biyofilm ile ilişkili virülans genlerinin (*gelE* ve *esp*) tespitinde PZR kullanıldı. Analiz edilen 300 örneğin 40'ından (%13.3) *E. faecalis* izole edildi ve bu izolatların 35 (%87.5) biyofilm oluşturma yeteneğinde idi. Biyofilm pozitif olan izolatların 33'ünde (%82.5) *gelE* geni belirlendi ve bu izolatların biri (%2.5) *esp* genini de içeriyordu. Sonuç olarak, çalışmanın yapıldığı kesimhane ortamından biyofilm oluşturan *E. faecalis*'lerin izole edilmesi kesimhanede fekal kontaminasyonun yaygın olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla kesimhanede hijyenik koşulların iyileştirilmediği takdirde karkasların *E. faecalis* ile çapraz kontaminasyon riski gıda tedarik zincirinde önemli bir endişe kaynağı olabilir.

Anahtar Kelimeler: *E. faecalis*, Karkas, Mezbaha, Mezbaha atık suyu, Sığır

Biofilm Forming Capacity and Presence of Biofilm-Associated Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* isolates from Slaughterhouse Environments

Abstract: This study aims to investigate the presence of biofilm-producing *Enterococcus* and their biofilm-related virulence factor genes in the slaughter line of a class A cattle slaughterhouse in Kayseri. A total of 300 samples (180 carcasses, 48 knives, 6 saws, 42 hooks, 6 skin bands and surfaces, and 18 samples of slaughterhouse wastewater) were analyzed using conventional methods and PCR. The biofilm-forming abilities of the isolates were determined using Congo red agar and microplate testing, and PCR was used to detect biofilm-associated virulence genes (*gelE* and *esp*). *E. faecalis* was isolated from 40 (13.3%) of analyzed samples, of which 35 (87.5%) produced biofilms. The *gelE* gene was detected in 33 (82.5%) biofilm-positive isolates, from which one (2.5%) contained also *esp* gene. In conclusion, this study determined the presence of biofilm-positive *E. faecalis* among the samples taken from a slaughterhouse in Kayseri province, and the relationship between virulence genes and biofilm formation. In conclusion, the isolation of biofilm-forming *E. faecalis* from the slaughterhouse environment indicates that fecal contamination is common in slaughterhouses. Therefore, if hygienic conditions in the slaughterhouse are not improved, the risk of cross-contamination of carcasses with *E. faecalis* can be a major concern in the food supply chain.

Keywords: *E. faecalis*, Carcass, Cattle, Slaughterhouse, Slaughterhouse wastewater

1.Giriş

İnsan ve hayvanların doğal biotasının yanı sıra bitki, toprak, deniz ve atık su gibi birçok yerde bulunan *Enterococcus* spp., olumsuz çevre koşullarına karşı oldukça dayanıklı Gram pozitif bakterilerdir. *Enterococcus* spp., gıdalarda hijyen indikatörü olarak kullanılmalara ilaveten bazı türleri de bakteriyosin üretim yeteneklerinden dolayı gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılmaktadır (1,2). Normal biotanın fırsatçı patojenleri olan *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ve *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) klinik örneklerden ve gıdalardan yaygın olarak izole edilen türlerdir (2-4). *Enterococcus* spp.'nin neden olduğu

nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık % 90'ından *E. faecalis*, %10'undan *E. faecium*'un sorumlu olduğu rapor edilmiştir (1,2,5). *Enterococcus* spp.'nin patojenitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri biyofilm oluşturma kabiliyetidir. Biyofilm tabakası içerisinde bulunan mikroorganizmaları konak immünolojik yanıtlarından, fagositozdan ve antibiyotiklerden koruyarak hastalıkları komplike hale getirir (6) ve serbest bakterilerden 10-1000 kat daha fazla antimikrobiyal direnç geliştirebilirler (7). Nozokomiyal enfeksiyonların %65'inden fazlası ve

bakteriyel enfeksiyonların % 80'inin biyofilm oluşturabilen bakterilerden kaynaklandığı bildirilmiştir (8).

Enterococcus spp.'nin patojenitesinin de agregasyon maddeleri (*agg*, *asa1*), sitolizin (*sil*), jelatinaz (*gelE*), hücre dışı yüzey proteini (*esp*), endokardit antijenleri (*efaAfs* ve *efaAfm*), kollajene yapışma (*ace*, *acm*) gibi virülans faktörleri önemli rol oynamaktadır (1,3,4).

Bu virülans faktörlerden jelatinaz ve hücre dışı yüzey proteinlerinin, etkenin biyotik ve abiyotik yüzeylere kolonize olmasını sağlayarak biyofilm oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (7,9,10).

Fekal *Enterococcus* türleri mezbahalarda hayvansal gıda ürünlerini kontamine edebilir. Bu bakteriler özellikle hayvanların gastrointestinal sisteminde yaşadıkları için kesim sonrası deri yüzme, iç organ çıkarma gibi işlemler sırasında karkası kontamine edebilir (11,12). Kayseri mezbahalarının çoğunda deri yüzme ve iç organ çıkarma işlemlerinin manuel olarak gerçekleştirilmesi fekal kontaminasyon riskini artırmaktadır. Bu çalışmada, Kayseri ilinde bulunan birinci sınıf kesimhanede sığır kesim hattından alınan örneklerde mezbahanın hijyenik kalitesini yansıtan bakterilerden *E. faecalis* varlığı, elde edilen

izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri ve biyofilm oluşumu ile ilişkili virülans faktör genleri araştırıldı.

2. Materyal ve Metot

Kayseri ilinde birinci sınıf kombina olarak faaliyette bulunan büyükbaş hayvan kesimhanesine birer aylık periyotlarla 10 Mart- 10 Ağustos 2022 tarihleri arasında yapılan ziyaretlerde toplam 300 örnek toplandı (Tablo 1). Swap örnekleri soğuk zincir altında en kısa süre içerisinde laboratuvara getirildi ve *Enterococcus faecalis* varlığı yönünden analiz edildi.

Karkastan alınan swap örnekleri, karkasın son yıkamasından sonra ISO standardı 17604'e göre alındı. Kısaca, seçilen her bir yarım karkasın dört bölgesinden (boyun, döş, yan ve sağrı) steril kare plastik bir şablon kullanılarak, yaklaşık 100 cm²'lik bir alandan (toplam: 400 cm²) örnekleme yapıldı (13). Alet ve ekipman (bıçaklar, yarma testeresi, çengel) ve yüzey örnekleri, Stuart Besiyerli Swab (BTR, Ankara) kullanılarak yaklaşık 10 cm²'lik bir alandan alınmıştır (14). Atık su örnekleri ise kesimi takiben aseptik koşullarda steril plastik tüpler içerisinde 50 mL hacminde olacak şekilde toplandı (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışma süresince farklı mezbahalarda yapılan örnekleme

Alınan Örnek	Mezbaha Ziyaret Dönemlerinde alınan Örnek Sayısı						Total örnek Sayısı
	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	
Karkas Yüzey	30	30	30	30	30	30	180
Ekipman ve Yüzey	17	17	17	17	17	17	102
Bıçaklar	8	8	8	8	8	8	48
Testere	1	1	1	1	1	1	6
Çengel	7	7	7	7	7	7	42
Deri Bandı	1	1	1	1	1	1	6
Atık Su	3	3	3	3	3	3	18
							300

2.1. *Enterococcus* spp. İzolasyonu

Analiz edilecek örnekler ilk aşamada Enterococcosel Broth'ta (Becton Dickinson, ABD) 35±1°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürden 0.1 mL Enterococcosel agara (Becton Dickinson, USA) ekim yapılarak 35±1°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Besi yerinde üreyen şüpheli koloniler seçilerek Gram boyama ve biyokimyasal (katalaz ve %6,5 NaCl'de büyüme) testlerle doğrulandıktan sonra izolatlar moleküler analizlere tabii tutuldu (15).

2.2. DNA Ekstraksiyonu

İzolatların DNA ekstraksiyonu Genomik DNA İzolasyon Kiti (InstaGene™ Matrix, BIO-RAD, ABD) kullanılarak kit protokolünün öngördüğü şekilde gerçekleştirildi.

2.3. *Enterococcus* spp. ve *E. faecalis* İdentifikasyonu

Enterococcus spp. izolatlarının doğrulanması ve *E. faecalis* 'in identifikasyonu için sırasıyla Sanderson ve ark. (16), Delibas ve Turkyılmaz (17) tarafından belirtilen klasik PZR tekniği kullanıldı. Reaksiyon karışımı; toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1xPCR buffer, 0.2 mM dNTP miks, 2 mM MgCl₂, 1.5 U Taq DNA polimeraz, her bir primerden 10 pmol ve 5 µL DNA'dan oluştu. Çalışmada kullanılan primer dizilimleri ve PZR koşulları Tablo 2'de belirtildi (16,17).

Tablo 2: Çalışmada kullanılan primerler ve PZR koşulları

	Hedef Gen	Primer Dizilimi (5'-3')	Baz Büyüklüğü (bp)	PCR koşulları	Kaynak
<i>Enterococcus spp.</i>	23SRNA	GAGAAATTCCAAACGAACTTG CAGTGCTCTACCTCCATCATT	93	95°C'de 10 dk. 95°C'de 15 sn. 60°C'de 1 dk. 72°C'de 1 dk. } 40s	Sanderson ve ark., (2019)
<i>E. faecalis</i>	ddl _{E. faecalis}	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTCACG	475	94°C'de 3 dk. 94°C'de 1 dk. 54°C'de 1 dk. 72°C'de 1 dk. 72°C'de 7 dk. } 30s	Delibas ve Turkyılmaz, (2018)
Jelatinaz	gelE	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	419	95°C'de 3 dk. 95°C'de 30 sn. 56°C'de 30 sn. } 35s 72°C'de 1 dk.	Gajewska ve ark., (2023) Li ve ark., (2019)
Yüzey proteini	espfs	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	72°C'de 10 dk	Metev ve ark., (2017)

2.4. İzolatların Biyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen izolatların biyofilm oluşturabilme kabiliyetleri, Kongo Red Agar (CRA) yöntemi ve Mikroplak Yöntemi ile analiz edildi (8,18).

2.5. Kongo Kırmızılı Agar Yöntemi

Elde edilen *E. faecalis* CRA'ya yayma plak tekniği ile ekildikten sonra 35±1°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan izolatlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan izolatlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi (8,18,19).

2.6. Mikroplak Yöntemi

Bu yöntemde 96 oyuklu düz tabanlı steril polistiren plakalar üzerinde *E. faecalis* izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri test edildi. Kısaca, izolatlar %2 glikoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Almanya) 35±1°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra kültürler %2 glikoz içeren taze TSB içinde 1:100 seyreltildi. Her bir izolatin seyreltilmiş kültüründen 100 µL düz tabanlı bir polistiren mikrotitre plakasının (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) kuyucuklarına ilave edildi ve 35±1°C'de 24 saat inkübe edildi. Çalışmada sadece TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol, TSB ve biyofilm kabiliyeti olan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 içeren kuyucuklar ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuk üç kez 300 µL fosfat tampon salin solüsyonu (PBS; pH 7.2) yıkandı. Daha sonra 100 µL %1'lik kristal viyole ile boyanarak 30 dakika bekletildikten sonra kuyucuklar steril distile su ile üç kere yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi takiben yapışık hücrelerin sabitlenmesi için kuyucuklara 150 µL %99 etanol ilave edildi ve kuyucukların optik dansitesi (OD) 570 nm'de ELISA (Thermo-Scientific, Waltham, ABD) cihazında

ölçüldü (18,19). Elde edilen OD değerleri "cut off" (sınır) değerlerinin dönüşümleri de esas alınarak değerlendirildi. Sınır değerleri negatif kontrolün ortalama OD'sinin üç standart sapma fazlası olarak değerlendirildi (20).

2.7. Biyofilm Oluşumu ile İlişkili Virülans Faktörlerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen izolatlar da biyofilmle ilişkili olarak *esp* ve *gelE* virülans genlerinin varlığını daha önceki çalışmalarda (7,18,21) yayınlanmış spesifik primerler ve prosedürler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla PZR karışımı 12.5 µL 2X PCR master miks-DreamTaq Green PCR (Thermo, ABD), her bir primerden 0.5 µL (10 pmol), 9.5 µL steril saf su ve 2 µL template DNA ile 25 µL toplam hacimde olacak şekilde hazırlandı. Amplifiye PZR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde 120 V'ta 45 dk elektroforez (EC250-90, Thermo, ABD) işleminden sonra, UV jel görüntüleme sistemi (Biorad Gel Doc XR, ABD) ile değerlendirildi.

3. Bulgular

Çalışma kapsamında analiz edilen 300 örneğin 212'si (% 70.6) konvansiyonel yöntemle *Enterococcus spp.* olarak belirlendi. Bu izolatlara uygulanan PZR yönteminde ise 212 örneğin 177'si (% 83.5) *Enterococcus spp.* olarak konfirme edildi (Resim 1). Bu izolatların 72'si (% 40.6) mezbaha atık sularından, 65'i (% 36.7) karkas, 14'ü (% 7.9) bıçak, 10'u (% 5.6) deri bandı, 8'i (% 4.5) çengel ve 8'i (% 4.5) testereden elde edildi.

Çalışmada ziyaret edilen mezbahada çeşitli kaynaklardan izole edilen 177 *Enterococcus spp.* izolatının 40'ı (% 22.5) *E. faecalis* olarak tanımlandı (Resim 2).

Elde edilen *E. faecalis* izolatlarının 18'i (% 100) mezbaha atık sularına, 13'ü (% 7.2) karkas, 9'u (% 8.8) ekipman ve yüzey örneklerine aitti. Analiz edilen 40 *E. faecalis* izolatının 35'i (% 87.5) biyofilm oluşturma yeteneği

sergiledi. Bu izolatlardan 33'ü (% 82.5) jelatinaz kodlayan *gelE* genini taşıyordu ve bu izolatlardan bir tanesinde (%

2.5) *esp* proteini kodlayan *esp* geni de mevcuttu (Tablo 3).

Tablo 3: Analiz edilen örneklerde *E. faecalis* dağılımı ve özellikleri

Analiz Edilen Örnek	İzole Edilen <i>E. faecalis</i> Oranı (%)	<i>E. faecalis</i> İzolatlarının Biyofilm Yapma Kabiliyeti (%)			Biyofilm ile İlişkili Genleri Varlığı (%)	
		CRA	MPT		<i>gelE</i>	<i>esps</i>
			G	O		
Karkas (n=180)	13 (7.2)	13 (100)	4 (30.7)	7 (53.8)	12 (92.3)	-
Mezbaha Atık Suyu (n=18)	18 (100)	14 (77.7)	5 (27.7)	11 (61.1)	14 (77.7)	
Ekipman ve Yüzey (n=102)	9 (8.8)	8 (88.8)	6 (66.6)	2 (22.2)	7 (77.7)	1 (11.1)
Bıçak (n=48)	2 (4.1)	2 (100)	-	2 (100)	2 (100)	-
Çengel (n=42)	2 (4.7)	2 (100)	1 (50)	-	-	-
Testere (n=6)	2 (33.3)	2 (100)	2 (100)		2 (100)	
Deri Bandı (n=6)	3 (50)	2 (66.6)	3 (100)	-	3 (100)	1 (33.3)
Toplam (n=300)	40 (13.3)	35 (87.5)	15 (37.5)	20 (50)	33 (82.5)	1 (2.5)

4. Tartışma ve Sonuç

Enterococcus türleri arasında, *E. faecalis* hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde en çok izole edilen türdür. Hayvansal kaynaklı gıdalardan çiğ etin etken ile kontaminasyonu daha çok mezbahalardaki kesim işlemleri esnasında yetersiz hijyen uygulamaları ile meydana gelmektedir (2,11). Bu nedenle kesim işlemi sırasında yenilebilir karkas dokularının çapraz kontaminasyonu önemli bir gıda güvenliği riskini temsil eder (11,12). Daha önce yapılan çalışmalarda birçok hayvansal gıda örneğinde *E. faecalis* izolasyonu yapılmıştır (1,10,17,19,22,23). Fakat mezbaha ortamında *Enterococcus* spp.'nin varlığı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada mezbahada analiz edilen örneklerin %83.5'ü *Enterococcus* spp. pozitif olarak belirlendi. Bu çalışmada test edilen örneklerde *Enterococcus* spp.'nin pozitiflik oranının yüksek olması çalışmanın gerçekleştirildiği mezbahada hijyen koşullarının yetersiz olduğunu göstermektedir. Çalışılan örneklerin etken ile kontaminasyonu; kesim, deri yüzme, iç organ çıkarma ve etin işlenmesi sırasında kötü hijyen uygulamaları nedeniyle meydana gelebilir (12). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile uyumlu olarak Aslam ve ark. (24), Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25), Schlegelová ve ark. (26) mezbaha ve et işletmelerinde analiz edilen örneklerin sırasıyla % 87, % 72 ve % 66'sında *Enterococcus* spp. izole etmişlerdir. Buna karşılık Wambui ve ark. (12) ve Mansour ve ark. (27)'un mezbaha örneklerinde rapor etmiş olduğu sırasıyla % 25 ve % 12'lik *Enterococcus* spp. pozitiflik oranı bu çalışma sonucuna göre oldukça düşüktü.

Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) rapor ettikleri orana benzer olarak (% 25), bu çalışmada elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının % 22.5'i (analiz edilen örneklerin % 13.3'ü) *E.*

faecalis olarak belirlendi. Fakat Wambui ve ark. (12), Aslam ve ark. (24)'nın mezbaha izolatlarından elde ettikleri % 41,8, % 83'lük *E. faecalis* pozitiflik oranı bu çalışma sonucundan yüksekti. Buna karşılık, Mansour ve ark. (27) tarafından rapor edilen *E. faecalis* izolasyon oranı (% 6.7) bu çalışma sonuçlarından düşüktü.

Sunulan çalışmada analiz edilen karkas örneklerinde belirlenen % 7.2 *E. faecalis* izolasyon oranı, Klein ve ark. (28), Chingwaru ve ark. (22), Aslam ve ark. (24), Schlegelová ve ark. (26), Wambui ve ark. (12), Golob ve ark. (1), Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) ve Gürkan ve ark. (19) tarafından bildirilen (sırasıyla % 87, % 57.2, % 90, % 45, % 41.8, % 85., % 90 ve % 45) orandan düşük iken Mansour ve ark. (27) tarafından bildirilen orandan (% 2) yüksekti. Ayrıca Telli ve ark. (29) analiz ettikleri karkas örneklerinin hiç birisinde *E. faecalis* tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Çalışmalar arasındaki bu farklılıklar, coğrafi konum, numune alma mevsimi, örnek büyüklüğü, izolasyon yöntemindeki farklılıklar ile ilişkili olabilir. Mezbahada kullanılan ekipmanlardaki oran değerlendirildiğinde bu çalışma ekipman ve yüzey örneklerinin % 8.8'inde *E. faecalis* izole edildi. Aslam ve ark. (24) mezbahadaki konveyörlerin % 83 oranında, Wambui ve ark. (12) bıçakların % 16.7, Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) ve Schlegelová ve ark. (26) ise yüzey ve ekipman örneklerinin sırasıyla % 72 ve % 78 oranında *E. faecalis* tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, daha önce yapılan çalışmalarda mezbahada kullanılan alet ve ekipmanların hayvansal gıda üretiminde halk sağlığı açısından önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir (30,31). Çalışmada analiz edilen mezbaha

atık sularının tamamından *E. faecalis* izole edildi. Mezbahalarda kesimden kaynaklanan atık suları yüksek miktarda içerdikleri lipitler ve proteinler gibi organik bileşiklerden dolayı patojenlerin gelişmesi için ideal ortamlardır (31, 32). Yapılan literatür taramalarında mezbaha atık suları ile ilgili çok sınırlı çalışmalardan Mansour ve ark. (27) mezbaha atık sularında % 4, Igbinosa ve Raje (32) % 52,6, Igbinosa ve ark. (33) ise % 25.6 oranında *E. faecalis* izole etmişlerdir. Bu sonuçlar, mezbaha atıksularının *E. faecalis* için önemli bir kontaminasyon kaynağı olacağını göstermektedir. Dolayısıyla, arıtılmamış veya yetersiz arıtılmış atık suların çevreye salınımı veya tarımsal sulamada kullanılması halk sağlığı açısından potansiyel bir risk olabilir (34,35).

Çalışma kapsamında elde edilen *E. faecalis* izolatlarının % 87.5'i biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti. Benzer şekilde, Igbinosa ve ark. (33) mezbaha ortamından izole ettikleri *E. faecalis* izolatlarının tamamının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ławniczek-Wałczyk ve ark. (25) et tesisinden izole ettikleri *E. faecalis* izolatının % 43'ünün biyofilm oluşturma yeteneğinin olduğunu rapor etmişlerdir. Yine Azizi ve ark. (36) klinik izolatlardan, Anderson ve ark. (10), Wozniak-Biel ve ark. (37) ve Gürkan ve ark. (19) gıdalardan izole ettikleri *E. faecalis* izolatlarının sırasıyla, % 76, % 39, % 100 ve % 16.6'sının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Günümüzde, patojenik bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneği önemli virülans faktörleri arasında sayılmaktadır (25,38). Anderson ve ark. (10) ve Azizi ve ark. (36) ve Igbinosa ve ark. (33) tarafından yapılan çalışma sonuçlarına benzer şekilde, bu çalışmada biyofilm pozitif 35 *E. faecalis* izolatları arasında 33'ü (% 82.5) jelatinaz kodlayan *gelE* genini taşıyordu ve bu izolatlardan bir tanesinde (% 2.5) *esp* proteini kodlayan *esp* geni de mevcuttu. Di Rosa ve ark. (39), Azizi ve ark. (36) ve Ozkok ve ark. (9) *esp* virülans faktör geni ve biyofilm oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Tsirikonis ve ark. (40), Soares ve ark. (41) ve Azizi ve ark. (36) biyofilm oluşumu için *gelE* geninin önemli bir role sahip olduğunu ve bu genlerin varlığının biyofilm oluşumu ile önemli oranda ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Kayseri ilindeki kesimhaneden alınan tüm örnek türlerinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *E. faecalis*'i varlığı ve biyofilm oluşumunun virülans faktör genleri ile ilişkili olduğu belirlendi. Kesimhane ortamında fekal kontaminasyon indikatörü olan *E. faecalis*'lerin bulunması, kesim hattında hijyenik koşulların yetersiz olduğunu orta koymaktadır. Ayrıca, izole edilen *E. faecalis* izolatları biyofilm yapma yetenekleri sayesinde, kontamine yüzeyler ve et yoluyla besin zincirinde kolayca yayılarak insanlara bulaşabilir ve dolayısıyla gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturabilir. Bu nedenle, kesimhanelerde *E. faecalis* ile kontaminasyon

riskini önlemek ya da azaltmak için, hijyenik koşulların iyileştirilmesi gereklidir. Bu amaçla kesim hattında GMP ve HACCP sistemleri etkin bir şekilde uygulanmalı, kesimhane personeline hijyen eğitim verilmeli ve atık sular özenle arıtıldıktan sonra kanalizasyona verilerek olası çevre kirlenmesi önlenmelidir.

Kaynaklar

1. Golob M, Pate M, Kušar D, Dermota U, Avberšek J, Papič B, et al. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 1–12. doi:10.1155/2019/2815279.
2. Cattoir V. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. *Curr Opin Microbiol* 2022; 65: 73–80. doi:10.1016/j.mib.2021.10.013.
3. Azimi Mahalleh A, Göncüoğlu M. Enterokokların önemli virülens faktörleri ve gıdalarda bulunuşu. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 2014; 25: 47–52.
4. Ben Braïek O, Smaoui S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int* 2019; 2019: 5938210. doi:10.1155/2019/5938210.
5. Makarov DA, Ivanova OE, Pomazkova A V., Egoreva MA, Prasolova O V., Lenev S V., et al. Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia. *Vet World* 2022; 15: 611. doi:10.14202/VETWORLD.2022.611-621.
6. Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype–genotype correlations and distribution of key virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolated from patients with urinary tract infections. *Infect Drug Resist* 2021; 14: 1713–23. doi:10.2147/IDR.S305167.
7. Li Y, Pan J, Wu D, Tian Y, Zhang J, Fang J. Regulation of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation and Quorum Sensing Related Virulence Factors with Ultra-low Dose Reactive Species Produced by Plasma Activated Water. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2019; 39: 35–49. doi:10.1007/S11090-018-9930-2.
8. Khalil MA, Alorabi JA, Al-Otaibi LM, Ali SS, Elsilik SE. Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Urinary Tract Infections. *Pathogens* 2022; 12: 34. doi:10.3390/PATHOGENS12010034.
9. Ozkok Z, Bilgin K, Cayci YT, Birinci A. Investigation of biofilm formation of *Enterococcus* species isolated from blood by phenotypic and genotypic methods. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2021; 78: 363–72. doi:10.5505/TurkHijyen.2021.02328.
10. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: Prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol* 2016; 6: 1534. doi:10.3389/FMICB.2015.01534/BIBTEX.
11. Ramos S, Igrejas G, Capelo-Martinez JL, Poeta P. Antibiotic resistance and mechanisms implicated in fecal enterococci recovered from pigs, cattle and sheep in a Portuguese slaughterhouse. *Ann Microbiol* 2012; 62: 1485–94. doi:10.1007/S13213-011-0402-7.
12. Wambui J, Tasara T, Njage PMK, Stephan R. Species Distribution and Antimicrobial Profiles of *Enterococcus* spp. Isolates from Kenyan Small and Medium Enterprise Slaughterhouses. *J Food Prot* 2018; 81: 1445–9.
13. ISO. Microbiology of the food chain — Carcass sampling for microbiological analysis ISO 17604:2015 -. 2015.

14. Güzel N, Ertaş Onmaz N. Toplu Yemek Üretimi Yapan Bir İşletmede Personel ve Gıda Temas Yüzeylerinin Mikrobiyolojik Yönden Değerlendirilmesi. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine Erciyes University* 2022; 19: 189–94. doi:10.32707/ERCIVET.1204281.
15. Yoon S, Kim Y Bin, Seo KW, Ha JS, Noh EB, Lee YJ. Characteristics of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from broiler breeder farms. *Poult Sci* 2020; 99: 6055–61. doi:10.1016/J.PS.2020.06.087.
16. Sanderson H, Ortega-Polo R, McDermott K, Zaheer R, Brown RS, Majury A, et al. Comparison of biochemical and genotypic speciation methods for vancomycin-resistant enterococci isolated from urban wastewater treatment plants. *J Microbiol Methods* 2019; 161: 102–10. doi:10.1016/j.mimet.2019.04.019.
17. Delibas Y, Turkyılmaz S. Mastitisli Sığır Süt Örneklerinden Elde Edilen *Enterococcus faecium* İzolatlarında Bazı Bakteriyosin Genlerinin Saptanması. *Van Veterinary Journal* 2018; 29: 27–32. doi:10.1186/S13567-017-0425-6.
18. Gajewska J, Chajęcka-Wierzchowska W, Byczkowska-Rostkowska Z, Saki M. Biofilm Formation Capacity and Presence of Virulence Determinants among *Enterococcus* Species from Milk and Raw Milk Cheeses. *Life* 2023; 13: 495. doi:10.3390/LIFE13020495/S1.
19. Gürkan T, Külahcı MB, Çıtak S. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin çeşitli virülans özellikleri, biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi. *European Journal of Science and Technology* 2021; 28: 924–32. doi:10.31590/ejosat.1012135.
20. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40: 175–9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).
21. Mete E, Kaleli İ, Cevahir N, Demir M, Akkaya Y, Kiris Satılmış Ö. Enterokok Türlerinin Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51: 101–14. doi:10.5578/mb.53992.
22. Chingwaru W, Mpuchane SF, Gashe BA. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Milk, Beef, and Chicken and Their Antibiotic Resistance. *J Food Prot* 2003; 66: 931–6. doi:10.4315/0362-028X-66.6.931.
23. Kim E, Shin SW, Kwak HS, Cha MH, Yang SM, Gwak YS, et al. Prevalence and characteristics of phenicol-oxazolidinone resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food-producing animals and meat in Korea. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 11335. doi:10.3390/IJMS222111335/S1.
24. Aslam M, Diarra MS, Service C, Rempel H. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. recovered from a commercial beef processing plant. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 235–41. doi: 10.1089/fpd.2009.0380.
25. Ławniczek-Walczuk A, Cyprowski M, Górny RL. Distribution of Selected Drug-resistant *Enterococcus* Species in Meat Plants in Poland. *Rocznik Ochrona Środowiska* 2022; 24: 345–59. doi:10.54740/ros.2022.024.
26. Schlegelová J, Babák V, Holasová M, Konstantinová L, Necidová L, Šišák F, et al. Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci* 2010; 28: 450–61. doi:10.17221/65/2009-CJFS.
27. Mansour AM, Nossair MA-S, Soliman FS, Rabah I, Saleh NA. Detection of *Enterococcus faecalis* as an Indicator Organism in Abattoirs' Environment as well as Meat. *Matrouh Journal of Veterinary Medicine* 2023; 3: 12–8.
28. Klein G, Pack A, Reuter G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 1825–30. doi:10.1128/AEM.64.5.1825-1830.1998/FORMAT/EPUB.
29. Telli N, Telli AE, Biçer Y, Turkal G, Uçar G. Isolation and antimicrobial resistance of vancomycin resistant *Enterococcus* spp. (VRE) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) on beef and chicken meat, and workers hands from slaughterhouses and retail shops in Turkey. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2022; 72: 3345–54. doi:10.12681/jhvms.29373.
30. Gonulalan Z, Bacak M, Ertas N. Evaluation Of Microbiological Indicators For Haccp Cattle Slaughterhouse Line In A Business Operator. *MANAS Journal of Engineering* 2014; 2: 23–9.
31. Geçer A, Ertaş Onmaz N. Kanatlı Kesimi Aşamalarında *E. Coli* O157:H7 Varlığının IMS-PZR Yöntemleri ile İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 2018; 13: 285–92. doi:10.17094/ATAUNIVBD.356910.
32. Igbinsa IH, Raje OC. Characterization of *Enterococcus* species isolated from abattoir environment in Benin city, Nigeria. *Ife Journal of Science* 2020; 21: 81. doi:10.4314/IJS.V21I3.8.
33. Igbinsa EO, Beshiru A, Odjadjare EEO. Diversity, antimicrobial characterization and biofilm formation of *Enterococci* isolated from aquaculture and slaughterhouse sources in Benin City, Nigeria. *Ife Journal of Science* 2021; 22: 51–63. doi:10.4314/ij.s.v22i3.4.
34. Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Zaid CZM, Yardi A, Shukor RA, et al. Characterization and risk factors of vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE) among animal-affiliated workers in Malaysia. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 1184–95. doi:10.1111/J.1365-2672.2012.05406.X.
35. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, et al. Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *J Vet Med Sci* 2014; 76: 685–92. doi:10.1292/JVMS.13-0423.
36. Azizi M, Hasanvand B, Kashef M, Alvandi AH., Abiri R. Virulence Factor and Biofilm Formation in Clinical *Enterococcal* Isolates of the West of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2017; 10: 14379. doi:10.5812/jjm.14379.
37. Woźniak-Biel A, Bugla-Płoskońska G, Burdzy J, Korzekwa K, Ploch S, Wieliczko A. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation in *Enterococcus* spp. Isolated from Humans and Turkeys in Poland. *Microb Drug Resist* 2019; 25: 277–86. doi:10.1089/MDR.2018.0221.
38. Ch'ng JH, Chong KKL, Lam LN, Wong JJ, Kline KA. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology* 2018 17: 82–94.
39. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola C, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256: 145–50. doi:10.1111/J.1574-6968.2006.00112.X.
40. Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Daponte A, et al. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microb Pathog* 2012; 52: 336–43. doi:10.1016/J.MICPATH.2012.03.003.
41. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, D'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 2014; 5: 634. doi:10.4161/VIRU.28998.