
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN ÇEŞİTLİ VİRULANS ÖZELLİKLERİ BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Tuğçe GÜRKAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğçe GÜRKAN

20/06/2022

GIDA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNİN ÇEŞİTLİ VİRULANS ÖZELLİKLERİ BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe GÜRKAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2022

ÖZET

Günümüzde hayvansal gıdaların yaygın tüketimi hastalıklar ve tedavileri açısından hayvansal gıdaların daha verimli hale getirilmesi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin yaygın olması ekonomi ve toplum sağlığı açısından sorunlara neden olmaktadır. Çalışmamızda Eylül-Aralık 2020 tarihlerinde her birinden 20 adet olmak üzere toplam 80 çiğ süt, peynir, çiğ tavuk ve çiğ etten izole edilen *Enterococcus* izolatlarının tanımlanması biyokimyasal testler ve identifikasyon işlemi MALDI-TOF Kütle Spektrofotometresi ile yapılmıştır. 42 (%70) *Enterococcus faecalis* ve 18 (%30) *Enterococcus faecium* olmak üzere 60 izolat elde edilmiştir. *E.faecium* ve *E.faecalis* türlerinin virülans özelliklerinden; efaA, esp, gelE, ccf,cpd, hyl genleri, lipaz, jelatinaz, DNAz, hemolitik aktiviteleri, S tabakası varlığı, biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnç profilleri araştırılmıştır. *E.faecium*'in %100 duyarlı olduğu antibiyotikler kloramfenikol, streptomisin, vankomisin, teikoplanin ve amoksisilin klavulonik asit, %97,6 norfloksasin, %95,2 ampisilin, %92,8 siprofloksasin, en fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik %90,4 tetrasiklindir. *E.faecium* türlerinin %100 duyarlı olduğu antibiyotikler ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, vankomisin, teikoplanin ve amoksisilin klavulonik asit, % 77,7 siprofloksasin, %72,2 norfloksasindir. En fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik %61,1 tetrasiklindir. Biyofilm aktiviteleri Kongo Red Agar'da 60 *Enterococcus* türünden 36'sı (%60) zayıf, 22'si (%36,6) orta kuvvetli, 2'si (%3,3) kuvvetli biyofilm üretmiştir. Mikroplak yönteminde *E.faecium* 2 (%3,3) kuvvetli, 8 (%13,3) orta kuvvetli, 32 (%53,3) zayıf biyofilm üretmiştir. *E.faecium* 1 (%1,6) orta kuvvetli, 17 (%28,3) zayıf biyofilm üretmiştir. Kuvvetli biyofilm üreten *Enterococcus* türleri saptanmamıştır. DNAz aktiviteleri tamamında pozitif sonuç verirken, lipaz ve jelatinaz aktiviteleri tamamında negatif gözlenmiştir. S tabakası varlığı *E.faecium*'da %16,6, *E.faecalis*'te %83,3 saptanmıştır.

Bilim Kodu : 20325
Anahtar Kelimeler : *Enterococcus*, Gıda, Virülans genler, Antibiyotik dirençliliği, Biyofilm
Sayfa Adedi : 79
Danışman : Prof. Dr. Sumru ÇITAK

DETERMINATION OF VARIOUS VIRULENCE PROPERTIES AND BIOFILM FORMATION ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *ENTEROCOCCUS* SPECIES ISOLATED FROM FOOD SAMPLES

(M. Sc. Thesis)

Tuğçe GÜRKAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2022

ABSTRACT

The widespread consumption of animal foods and the widespread use of antibiotics to make animal foods more efficient in terms of diseases and treatments cause problems in terms of economy and public health. In our study, the identification of *Enterococcus* isolates, 20 from each of which was isolated from a total of 80 raw milk, cheese, raw chicken and raw meat between September and December 2020, was performed by biochemical tests and MALDI-TOF Mass Spectrophotometer. 60 isolates were obtained, 42 (70%) *Enterococcus faecalis* and 18 (30%) *Enterococcus faecium*. The virulence characteristics of *E.faecium* and *E.faecalis* species; efaA, esp, gelE, ccf, cpd, hyl genes, lipase, gelatinase, DNAse, hemolytic activities, presence of S layer, biofilm formation and antibiotic resistance profiles were investigated. The antibiotics to which *E.faecium* is 100% susceptible are chloramphenicol, streptomycin, vancomycin, teicoplanin and amoxicillin-clavulanic acid, 97.6% norfloxacin, 95.2% ampicillin, 92.8% ciprofloxacin, 90.4% tetracycline to which it is most resistant. Antibiotics to which *E.faecium* species are 100% susceptible are ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, vancomycin, teicoplanin and amoxicillin-clavulanic acid, 77.7% ciprofloxacin, 72.2% norfloxacin. The antibiotic with the highest resistance is 61.1% tetracycline. Biofilm activities In Congo Red Agar, 36 (60%) weak, 22 (36.6%) moderately strong, 2 (3.3%) strong biofilms of 60 *Enterococcus* species were produced. In the microplate method, *E.faecium* produced 2 (3.3%) strong, 8 (13,3%) medium strong, 32 (53.3%) weak biofilms. *E.faecium* produced 1 (1.6%) medium-strength biofilm and 17 (28.3%) weak biofilms. Strong biofilm-producing *Enterococcus* species were not detected. While DNAse activities gave positive results in all, lipase and gelatinase activities were observed to be negative in all.

Science Code : 20325
Key Words : *Enterococcus*, Food, Virulence genes, Antibiotic resistance, Biofilm
Page Number : 79
Supervisor : Prof. Dr. Sumru ÇITAK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca tüm bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen, yardımlarıyla beni yönlendirip fikirleriyle beni her zaman destekleyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Sumru ÇITAK'a, çalışmalarım sırasında desteğini eksik etmeyen, her konuda bilgileriyle bana yardımcı olan değerli hocam Doç Dr. Ebru BEYZİ'ye ve laboratuvar çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan, manevi desteğiyle yol gösteren, bu süreç boyunca yanımda olan sevgili hocam Arş. Gör. Dr. Meryem Burcu KÜLAHCI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Araştırmalarım sırasında ve deney sürecimde bana yardımcı olan sevgili laboratuvar arkadaşım Adem YILMAZ'a, en önemlisi bana her zaman destek olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, beni verdiğim kararlarda hiçbir zaman yalnız bırakmayan, sevgili anne babam, Gonca–Lütfü GÜRKAN'a, kızkardeşlerim İlayda-Ecrin Kayra GÜRKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamız, 05/2020-19 kodlu proje ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir. Maddi ve manevi katkıları sebebiyle Gazi Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

RESİMLERİN LİSTESİ xi

SİMGELER VE KISALTMALAR xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. *Enterococcus* 'ların Genel Özellikleri 5

2.2. *Enterococcus*'ların Gıdalardaki Önemi 6

2.2.1. Fermente etler ve fermente etlerin mikrobiyolojik kalitesi 7

2.3. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları 8

2.4. *Enterococcus* Türlerinin Virülans Faktörleri 12

2.5. *Enterococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşturma 16

3. MATERYAL-METOD 19

3.1. Gıda Örneklerinin Toplanması 19

3.1.1. Örneklerin alınması ve analize hazırlanması 19

3.1.2. Çiğ süt örneklerinin analize hazırlanması 19

3.1.3. Peynir ve et örneklerinin analize hazırlanması 20

3.2. Gıda Örneklerinden *Enterococcus* İzolatlarının Tür Tanımlaması 20

3.3. Gıda örneklerinde *Enterococcus* İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Testler 20

3.3.1. Peptonlu su (Oxoid CM 9) 20

3.3.2. Slanetz bartley agar (LAB 166) 20

Sayfa

3.3.3. Gram boyama yöntemi 21
3.3.4. Katalaz testi 21
3.3.5. Oksidaz testi 22
3.3.6. %6,5'luk NaCl'de üreme 22
3.3.7. Eskülin hidrolizi 23
3.4. *Enterococcus* İzolatlarının Tür Seviyesinde Tanımlanmasının Doğrulanması 23
3.5. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi 24
3.5.1. Mueller Hinton Agar (LabM 39) 25
3.6. *Enterococcus* İzolatlarının Fenotipik Virülans Karakterlerinin Belirlenmesi .. 26
3.6.1. Hemolitik aktivite 26
3.6.2. Lipaz aktivitesi 27
3.6.3. Jelatinaz aktivitesi 27
3.6.4. DNAz aktivitesi 27
3.6.5. Yüzey tabakasının (S-tabakası) varlığı 28
3.7. Biyofilm Oluşumu 28
3.7.1. Kongo Red Agar yöntemi 29
3.7.2. Mikroplak yöntemi 29
3.8. *Enterococcus* İzolatlarının Genomik DNA İzolasyonu 31
3.9. *Enterococcus*'ların Virülans Genlerinin Tespiti için PZR 32
4. BULGULAR 37
5. TARTIŞMA 55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 79

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. EUCAST 2015'e göre *Enterococcus*'larda araştırmamızda kullanılan antibiyotik diskleri ve duyarlılık sınırları 25

Çizelge 3.2. Mikrotiter plaka yönteminde biyofilm oluşturmanın sınıflandırılması 30

Çizelge 3.3. Literatürden alınan primerler..... 35

Çizelge 4.1. Gıda örneklerinin örnek sayısına göre dağılımı 37

Çizelge 4.2. MALDI TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan *Enterococcus* türlerinin tür tayini..... 38

Çizelge 4.3. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus*'ların izole edildikleri materyallere göre dağılımları..... 39

Çizelge 4.4. Çiğ tavuk örneklerinden izole edilen 11 *Enterococcus* spp. izolatlarının numune türlerine göre dağılımı 39

Çizelge 4.5. Et örneklerinden izole edilen 12 *Enterococcus* spp. izolatının numune türlerine göre dağılımı 39

Çizelge 4.6. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençliliği 40

Çizelge 4.7. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarının antibiyotiklere göre sayısı ve oranları 41

Çizelge 4.8. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarının antibiyotiklere göre sayısı ve oranları 42

Çizelge 4.9. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları 43

Çizelge 4.10. Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının hemolitik aktivite sonuçlarına göre sayısı ve yüzde oranları 44

Çizelge 4.11. Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının yüzey tabakası (S-layer) bulundurup bulundurmaması 44

Çizelge 4.12. Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının yüzey tabakası (S-layer) varlığına göre TSA-C renk koyulukları sonuçlarının sayısı ve yüzde oranları 46

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.13. Gıda örneklerinden izole edilen toplam 60 *Enterococcus* spp. türü bakterinin Kongo Red Agar'daki biyofilm aktivite ölçüm sonuçları 46

Çizelge 4.14. 37°C'de 24 saat inkübasyonun kullanıldığı yönteme göre izolatların OD değerleri 48

Çizelge 4.15. 37°C'de 48 saat inkübasyonun kullanıldığı yönteme göre izolatların OD değerleri 50

Çizelge 4.16. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarının virülans özellikleri ve değerleri 51

Çizelge 4.17. *Enterococcus* spp. izolatlarının primer genlerinin PZR ile tanımlamaları ve oranları 53

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Bakterilerin biyofilm oluşturma mekanizması 17

Resim 3.1. Slanetz Bartley Agar'da üreme gösteren *Enterococcus* türleri 21

Resim 3.2. *Enterococcus* türlerinin Gram boyama sonrası mikroskop görüntüsü 21

Resim 3.3. *Enterococcus* türlerinde katalaz testi 22

Resim 3.4. 10^0C'de ve 45^0C'de üreme testi 23

Resim 3.5. Eskülin hidroliz testinin 24-48 saat inkübasyondan sonra (+) sonucu 23

Resim 3.6. BBL tanımlama cihazı 24

Resim 3.7. Antibiyotik duyarlılık testi 26

Resim 3.8. *Enterococcus*'ların TSA-C'de üremesi 28

Resim 3.9. Kongo Red Agar'da biyofilm oluşumu 29

Resim 3.10. Mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumu 30

Resim 3.11. Primer genlerin görüntüleme cihazı ile görüntülenmesi 35

Resim 4.1. *Enterococcus* türlerinde efaA geni (499 bp) agaroz jelde görüntüsü 53

Resim 4.2. *Enterococcus* türlerinde esp geni (504 bp) agaroz jelde görüntüsü 53

Resim 4.3. *Enterococcus* türlerinde gelE geni (402 bp) agaroz jelde görüntüsü 54

Resim 4.4. *Enterococcus* türlerinde ccf geni (543 bp) agaroz jelde görüntüsü 54

Resim 4.5. *Enterococcus* türlerinde cpd geni (782 bp) agaroz jelde görüntüsü 54

Resim 4.6. *Enterococcus* türlerinde hyl geni (276 bp) agaroz jelde görüntüsü 54

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
+	Artı
≤	Küçük eşit
≥	Büyük eşit
°C	Derece santigrat
g	Gram
L	Litre
ml	Mililitre

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
AM	Ampisilin
AMC	Amoksisilin Klavulonik Asit
BD	Becton Dickinson
BHI	Brain Heart Infusion Broth
C	Kloramfenikol
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CN	Gentamisin
E	Eritromisin
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Forward
Gr (-)	Gram negatif
Gr (+)	Gram pozitif
H_2O_2	Hidrojen peroksit
K	Kanamisin
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat

Kısaltmalar	Açıklamalar
NaCl	Sodyum klorür
NOR	Norfloksasin
R	Reverse
S	Streptomisin
SBA	Slanetz Bartley Agar
TE	Tetrasiklin
TEC	Teikoplanin
VA	Vankomisin

1. GİRİŞ

Enterococcus'lar, insan ve hayvanların gastrointestinal florasında bulunurlar. Hayvanlardan elde edilen gıdalarda olabileceği gibi hayvan ve insan kaynaklı kanalizasyon ve çevresel koşullar tarafından kontamine olmuş alanlarda yaygınlaşmışlardır (Franz ve ark., 2001, Oryaşın, 2008). *Enterococcus* türleri hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığa göre hayvansal kaynaklı birçok gıdada bulunabildiklerinden yapılan çalışmalarda *Enterococus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirildiği görülmektedir (Klein G., 2003). *Enterococcus*'lar gıdanın bir parçası olarak da bulunabileceği gibi yetersiz hijyen indikatörü olarakta değerlendirilebilirler. Aynı zamanda *Enterococcus*'lar yüksek sıcaklığa dayanıklı olduklarından ısıl işlem görmüş et ürünlerinde veya süt ürünlerinde pastörizasyon sonrası canlı kalabildikleri gibi dilimleme ve paketleme gibi işlem aşamalarında kontaminasyondan dolayı üründe bozulmalara sebep olabilirler. Bu bakterilerin istenmeyen ve olumsuz özelliklerinin yanı sıra birçok yararlı özellikleri de olduğundan gıda endüstrisinde yardımcı kültür, starter kültür ve probiyotik olarakta tercih edilmektedir (Klein G., 2003, İşleroğlu ve ark., 2008, Khan ve ark., 2010).

Gıdalar, gıda üretiminde kullanılan mikroorganizmaları ve gıdalarda bozulmaya veya gıda kaynaklı hastalıklara neden olan birçok mikroorganizmayı barındırmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklara ve enfeksiyonlara mikrobiyal toksinlerle ya da genellikle patojen mikroorganizmalar ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesiyle meydana gelen ve daha çok gastrointestinal florayı olumsuz etkileyen klinik durumlardır. Bu mikrobiyal nedenli hastalıklar; gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve gıda kaynaklı mikrobiyal intoksikasyonlar yoluyla meydana gelebilmektedir (Sağlam, 2016).

Hayvansal gıdalar (süt ve et ürünleri) ülkemizde çok sık tüketilen gıdalardır. Tavuğun kırmızı etten daha ekonomik olması, protein bakımından zengin, yağ içeriği açısından düşük, doymamış yağ asitleri oranının uygun olması sıkça tercih edilmesinde önemli bir yeri vardır. Ayrıca tavuk eti kolayca hazırlanabilen bir gıda olduğundan sokak lezzetleri veya tavuk döner gibi hazır besinleri satan yerlerde de yaygın bulunmaktadır. Ancak çiğ tavuk eti gıdalarda çabuk bozulmaya neden olan patojen olan çok sayıda mikroorganizmanın gelişip üremesi için uygun bir ortam sağlamaktadır. Gıda kaynaklı enfeksiyonların ve intoksikasyonların başında süt ve tavukla hazırlanan gıdaların önemli bir kaynak olduğu bilinmektedir. Hazır yemeklere ilgi arttığı için ve uygun olması nedeniyle kanatlı etleri

geldiğinden, çiğ tavuğun mikrobiyolojik kalitesi, kullanılan kanatlı ve kırmızı etlerin florasında bulunan mikroorganizmalar, saklama ve pişirme sırasındaki kontaminasyonlar ile ilişkilidir. Ülkemizde yapılan birçok araştırmayla tüketime hazır tavuk ve et ürünlerinin mikrobiyolojik kalite açısından yeterli uygunlukta olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmalar tavuk örneklerinde patojenlerin varlığını göstermektedir (Alçay ve ark., 2020).

İnsan beslenmesinde ve sofralarda önemli bir değeri olan süt, temiz alanlarda üretilmediği, uygun koşullarda saklanmadığı ve hijyenik şekilde işlenmediği zaman sağlık açısından zararlı bir hal alabilmektedir. Çiğ süt kendi florasında fazla mikroorganizma içermese dahi sağım sırasında ve sağımdan sonra çevresel etkenlerle bulaşan mikroorganizmaların etkisiyle çok kısa sürede bozulur ve insanlarda hastalıklara yol açarak patojenlerin potansiyel kaynağını oluşturmaktadır. Bu nedenle çiğ sütü doğrudan tüketmek doğru olmadığı gibi satın alırken ve tüketilirken çok dikkat edilmesi gereken bir üründür. Ülkemizde süt ve süt ürünlerinin üretimi oldukça yaygındır ve bu ürünler çiftliklerde, mandıralarda ve küçük işletmelerde bilinçsiz olarak üretilmektedir. Peynir mikroflorası, yapımı sırasında kullanılan süt ve starterin peynirdeki olgunlaşma sürecine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yöresel yöntemlerle peynir üretimi yapan, sütün sağımı ve depolanmasından sorumlu küçük işletmelerde hijyen ve sanitasyon koşulları yeterli olmadığında, mikroorganizma bulaşma kaynağı oldukça artmaktadır. Bu hijyenik olmayan sütler kullanılarak üretilen peynirlerin olgunlaşma süresinde patojen mikroorganizmalar canlı kaldığından bu ürünlerin satışa sunulması tüketici sağlığını tehdit etmektedir. Bu yetersiz ve bilinçsiz üretim koşulları nedeniyle süt ve peynirlerden gıda zehirlenmeleri ve enfeksiyon riski günden güne artmaktadır (Gündoğan ve Avcı 2014).

Normal florada fırsatçı patojen olarak yaşayan *Enterococcus*'lar, gıda da olduğu gibi hastane enfeksiyonları arasında ilk sıralarda yer bulunmaktadır. Bazı suşlarının yararlı özellikler gösterseler de *Enterococcus*'ların hastane kaynaklı klinik açıdan sağlığı tehdit eden patojenlerin arasında yer alırlar. *E. faecium* ve *E. faecalis*'in merkezi sinir sistemi gibi dokularda ve üriner sistemde enfeksiyonlara yol açabilmelerinin yanı sıra bakteriyemi ve endokarditis gibi hastalıklara yol açan fırsatçı patojenler olduğu görülmektedir. *Enterococcus*'ların patojenite mekanizmalarının güçlü olmasının nedenlerinin başında vankomisin gibi bazı antibiyotiklere direnç göstermelerinin yanı sıra fenotip ve genotipte gösterdikleri virülans faktörleri gelmektedir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017).

Enterokoklarda patojenik potansiyeli belirleyen virülans faktörlerinin belirli kombinasyonlarına ilişkin mevcut bilgilerin hala sınırlı olduğu belirtilmektedir (Franz ve ark., 2003).

Enterococcus'lar, fırsatçı patojen olarak intrinsik antimikrobiyal direnç gösterdiklerinden ve sayısız antibiyotik ajana direnç elde etmek için adapte olabildikleri için bir antibiyotik sınıfına ve alt sınıfına karşı çoklu direnç virülans potansiyellerinin ortaya çıkması ile hayati rollerini güçlendirir (Beshiru ve ark., 2017). *Enterococcus*'ların genetik elementleri birbirleriyle değiş tokuş etme kapasiteleri nedeniyle virülans faktörlerin *Enterococcus*'larda oldukça değişken olduğu görülmüştür (Camargo, 2014).

Ulusal ve uluslararası çalışmalarda enterokoklarda önemli virülans faktörü özelliği taşıyan enterokokal yüzey proteinleri (esp), jelatinaz (gelE) ve hücre duvarı yapışkanlığı (efaA), cinsiyet feromonları (ccf ve cpd) ve hiyalüronidaz (hyl) genlerinin enterokok enfeksiyonlarında rol oynadığı görülmüştür (Van Reenen ve Dicks, 2011).

Biyofilmler, başta konakçı sitemlerde yerleşik mikrobiyota, konakçı hücre immün yanıtları, antimikrobiyal bileşikler, pH, tuz ve sıcaklık değişkenlikleri çevresel stres koşulları altında, mikroorganizmanın bu koşullara karşı geliştirdiği formlardır. Patojen mikroorganizmaların önemli ölçüde kalıcılık ve inatçı enfeksiyon karakteristiği göstermelerinin nedeni biyotik ve abiyotik yüzeylerde yüksek oranda biyofilm yapıları oluşturma yeteneği içerdiklerindendir. Biyofilmler; gıda üretim ve gıda paketleme yüzeyleri, diş yüzeyi, su sitemleri, konakçı organizmanın mukozal yüzeyleri, tıbbi cihazlar gibi tüm yüzeylerde meydana gelmektedir. Yüksek oranda kalıcılık özellikleri olduğundan ve ciddi kontaminasyon kaynağı olduklarından, endüstriyel ve tıbbi alanlarda ciddi sorunlara neden olmaktadırlar (Donlan, 2002).

Araştırmamızda, Ankara'da farklı yerlerdeki pazarlarda, marketlerde, ve çiftliklerde satışa sunulan et ve süt ürünlerinden *Enterococcus*'ların izolasyonu ve tür tanımlamaları yapılarak, izolatlardaki antibiyotik dirençliliği belirlenmiştir. Ayrıca hemolitik aktiviteleri, virülans özellikleri ve biyofilm oluşturması ile bu özelliklerin arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Araştırmamızın sonuçları ile bu virülans özellikleri taşıyan türlerin belirlenmesi ve özellikle bu virülans genleri barındıran mikroorganizmalarla kontamine olan gıda ürünlerinin tüketilmesinin önüne geçilmesi ile halk sağlığına dikkat çekilecektir. Aynı zamanda

ekonomik açıdan insanlara kazanımlar sağlanacaktır. Gıdalarda kontaminasyona neden olacak maddelerin uygun ve daha az oranlarda kullanımları, enfeksiyon oluşumuna karşı dikkatli olunması, direncin gelişiminin durdurulması veya yavaşlatılmasının, gıda alanında patojen veya yararlı olan bakterilerle yapılan çalışmaların önemini daha da vurgulayıp arttırmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterococcus* 'ların Genel Özellikleri

Enterococcus spp., 1984 yıllarında taksonomide *Streptococcus* adı altında bilinmekteydi. 1989'da cinsin ilk tanımlaması Thiercelin tarafından yapılmış ve bu bakterileri *Enterococcus* olarak adlandırmıştır. Yeni sınıflandırmada *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olarak bilinen bakteriler önceki yıllarda *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* adı ile bilinmekteydiler. *Enterococcus*'lar, aerobik ya da fakültatif anaerobik olabilen, katalaz negatif, kok şeklinde besin gereksinimleri kompleks olan bakterilerdir. Diğer gram (+) bakterilere göre vitaminler ve temel amino asitlere ve daha çok besine ihtiyaç duyarlar. Arabinoz pozitif ve pürivat negatif olup laktozu fermente edebilme yeteneğine sahiptirler. İdeal üreme ısıları 35-37°C olmakla birlikte %6.5 NaCl'de üreme gösterirler. Birçok türde pozitif sonuç vermekle birlikte %40 safralı ortamda eskülini hidrolize edebilirler. Glikoz fermentasyonunun son ürünü laktik asittir ve glikozdan gaz oluşturmazlar. 60ºC'ye 30 dakika dayanabilmektedirler. Kanlı agarda 0,5-1,5 mm boyutlarında gri-beyaz kabarık koloniler olarak görünürler. Genellikle nonhemolitik olsalar da bazen zayıf bir alfa hemoliz meydana getirebilirler ancak *E. faecalis* türleri kanlı agarda beta-hemoliz yapabilirler (Barbosa, 2010).

Enterococcus'ların laboratuvar ortamında çoğaltılması ve canlılığını koruması kolay olmakla birlikte çoğu 60°C'de 30 dakika ısıtılmaya dayanıklıdır. Çok fazla donma ve sonra yeniden eritme işlemleri görmedikleri sürece buzdolabında -70°C'ye kadar yıllarca saklanabilirler. Normal etüv ortamı ve sıcaklığında, Trypticase-soy-%5 koyun kanlı agar gibi kanlı besiyerlerinde rahatlıkla ürer. İzolasyonlarında azide içeren besiyerleri seçicidir ve *Enterococcus*'lar için Slanetz Bartley besiyeri üremelerini kolaylaştıran seçici besiyeridir. Kanlı agarda 24 saat inkübasyondan sonra koloniler genelde 1-2mm büyüklüğünde görülür. (Murray ve ark., 1970/2009).

E. faecalis, hayvanların gastroistestinal sisteminde bulunmakla birlikte insan kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan türler olduğundan gastrointestinal flora üyesidir. %6,5'luk NaCl ve pH 9,6'da ürer. Beta hemolitiktir. Yara, pelvik apse, üriner enfeksiyon, periton sıvısı, endokardit ve kan kültürlerinden izole edilirler (Sayıner, 2008).

Yiyecekler, sebzeler ve yemlerden de izole edilen *E. faecium* türleri insan ve sığır gibi hayvanların gastrointestinal sisteminde bulunmakla birlikte alfa hemolitiktir ve %6,5'luk NaCl'de üreme gösterirler. *E. faecalis*'e göre antimikrobiyallere daha dirençlidir (Sayıner, 2008).

2.2. *Enterococcus*'ların Gıdalardaki Önemi

Enterococcus cinsi bakteriler, genelde fekal kontaminasyon kaynağı çevrelerde yüksek oranda bulunmalarına rağmen gıdaların üretim aşamalarında hijyenik ve uygun olmayan çevresel koşullar sonucunda veya intestinal kontaminasyonla da süt ve et gibi gıdalarda ortaya çıkarlar (Sanchez, 2006; Giraffa, 2003). Sıcaklık, pH ve tuza karşı olan dirençleri yüksek olduğundan, gıda üretimi sırasında olumsuz koşullara rağmen canlı kalırlar ve ürünleri kontamine ederler. Bu nedenle gıdalarda bulunmaları kontaminasyonun ve riskli bir durumun göstergesi olarak görülür. Gıdalarda bulunmaları kontaminasyonun bir göstergesi olarak düşünüldüğünden *Enterococcus*'lar gıda ürünlerinde ve sularda hijyen indikatörü olarak kullanılmaktadır (Golob ve ark., 2019).

Kesimhanelerde ete bulaşma potansiyelinin artması da hayvanların gastrointestinal sisteminde *Enterococcus*'ların bulunması ile ilgilidir. *E. faecalis* tavuk çiftliklerinde en çok izole edilen bakteri türleri içinde ilk sıralarda bulunmaktadır. *Enterococcus* cinsi bakteriler sadece kötü hijyen koşullarının sonucu değil gıdaların normal floralarının da bir parçası olarak bulunabilirler (Karataş, 2005; Giraffa, 2002). Bu bakteriler fermente et ürünlerinin ve bazı peynirlerin mikrofloralarının fermentasyonunda rol oynayan önemli mikroorganizmalardır (Karataş, 2005). Fermentasyonda görevli olmalarının yanı sıra sıcaklığa yüksek toleransı olan *Enterococcus*'ların bazıları bu dirençleri sayesinde ile pastörizasyon esnasında canlılıklarını koruyabilirler. Böylelikle pişmiş, dilimlenmiş veya paketlenmiş etlerde, fermente sucuklarda kontaminasyon nedeniyle çoğalarak et ürünlerinde bozulmaya neden olurlar (Semedo, 2003).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda gıda kaynaklı hastalıkların, mikrobiyal kontaminasyonlara bağlı olarak meydana gelmesinden dolayı patojenleri inhibe eden maddelere karşı merak günden güne artmaktadır. *Enterococcus*'lar sosis ve yağlardan, balıktan, sebzelerden, et ürünlerinden,süt ürünlerinden kolaylıkla izole edilebilmektedir s(Strompfova, 2008). Gıdalara uygulanan işlemler sırasında alet ve ekipmanların yanında

hijyen kurallarına uymayan personeller de gıdaların kontamine olmasına sebep olmaktadır. Bu dikkatsizlikler sonucu *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin yapılan birçok çalışmada gıdalarda en fazla bulunan bakteriler olduğu saptanmıştır (Keeratipibul ve ark., 2009).

Giao ve ark. (2022) çalışmasında 450 sığır ve domuz örneğinden toplam 314 olası *Enterococcus* spp. izole etmiştir. Cinse özgü PZR testi, *Enterococcus* cinsine ait 292 izolattan, sığırlardan 138 ve domuzlardan 154 izolat elde etmişlerdir. Multipleks PCR analizleri *Enterococcus hirae* (n = 107), *Enterococcus faecalis* (n = 84), *Enterococcus faecium* (n = 48), *Enterococcus casseliflavus* (n = 7) ve *Enterococcus durans* (n = 4) bulunmuştur. Bu sonuçlar sığır ve domuzlarda *Enterococcus*'ların farklı türlerinin sıklıkla bulunduğunu göstermiştir (Giao ve ark., 2022).

Togay ve Karayiğit (2022) geleneksel olarak yapılan koyun, keçi veya sığır sütünden elde edilen Urfa peynirinin üretimine starter ilavesi yapılmadığını ve bu peynirin üretiminde çiğ süt kullanılmasının ciddi halk sağlığı risklerine neden olabileceğini bildirmiştir. Aynı zamanda pastörizasyon işlemi çiğ sütteki laktik mikroflorayı öldürdüğü için peynirin lezzet kalitesini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir (Togay ve Karayiğit, 2022).

2.2.1. Fermente etler ve fermente etlerin mikrobiyolojik kalitesi

Farklı coğrafyalarda farklı yerlerde üretilen fermente et ürünleri, düşük pH, yüksek tuz konsantrasyonu, nem içeriği ve su aktivitesi ile dayanıklılık gösteren, raf ömrü uzun, insan beslenmesinde önemi büyük olan ürünlerdir. Fermente gıdalar farklı deneyimler yoluyla uzun bir zaman sonra mikroorganizma etkisi bilinmezken gelişmiş ve fermentasyonun ilk defa görülmesi ve gelişmesi, etlerin üretimiyle başlamıştır. İlk fermentasyon olayını 2000 yıl önce Çinliler gerçekleşmiştir. Zamanla fermentasyon yöntemi bilimsel bilgiler ışığında gelişmiş ve gıdalarda starter kültür kullanımı başlayarak yaygınlaşmıştır (Golob ve ark., 2019).

E.faecium ve *E.faecium* gıda proseslerinde gıdalardan yüksek oranda izole edilen türler olarak yer alırlar. Bu iki tür sucuklar başta olmak üzere fermente etlerin fermentasyonu sırasındaki baskın mikroflorayı meydana getirirler. Her iki tür de sucuk, salam gibi fermente gıdaların üretiminde ve peynir ve fermente süt ürünleri üretiminde raf ömrünü uzatan doğal

starter kültürlerdir. *E. faecalis* ve *E. faecium* karışık kültür olarak kullanılabileceği gibi yardımcı kültür amacıyla da kullanılırlar (Nasiri ve Hanifian, 2022;Golob ve ark., 2019).

Nasiri ve Hanifian (2022) 416 pastörize süt örneği ile yaptığı çalışmada %82,93'ünden (n=345) *Enterococcus* spp. izole etmiştir. Cinse özgü PZR tarafından takip edilen geleneksel tarama testleri sonucunda, *E. faecalis* %36,77 (n = 153) ve *E. faecium* ve %27.88 (n =116) bulunmuştur (Nasiri ve Hanifian, 2022).

Camargo ve ark. (2014) çalışmasında, 105 gıda örneğinin %95,2'sinden enterokokları izole etmişlerdir. Gıdalarda yüksek *Enterococcus* sıklığı daha önce Kuzey Amerika'da (Hayes ve ark., 2003; Johnston ve Jaykus, 2004), Avrupa'da (Koluman, 2009) ve Latin Amerika'da (Morales ve ark.,2004) yapılan çalışmalarda da görülmüştür. Bu sonuçlar gıdalarda *Enterococcus* varlığının coğrafik bölge ayırt etmeden ne kadar sıklıkla görüldüğünü kanıtlamıştır (Camargo ve ark., 2014).

Fracalanzza ve ark. (2007) et ve süt ürünü olmak üzere 50 numuneyi analiz ettikten sonra bunların %86,6'sının *Enterococcus* pozitif olduğunu gözlemledi (Fracalanzza ve ark., 2007).

2.3. Antibiyotik Direnci ve Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiğe çeşitli direnç mekanizmasına sahip ve belirli antibiyotiklere duyarlı bir suşun dirençli hale gelmesi ya da bir bakteri türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi antibiyotik direnci olarak tanımlanmaktadır. Toplumda çeşitli antibiyotiklerin tüketiminin artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımının artması, immun sistem rahatsızlığı yaşayan hastaların giderek artması, yoğun bakım ünitelerinde yatan hasta sayısında artış olması gibi nedenler bakterilerdeki antibiyotik direncinin giderek arttığını göstermiştir (Demirtürk ve Demirdal, 2004).

Bakteriler, antibiyotiklere doğal direnç göstermekle birlikte antimikrobiyal kullanımı ile ilişkili olan bu direnç türü bakterilerin temel özelliğidir. Mikroorganizmaların bir özelliği olan ilacın hedefindeki yapıyı tanımamalarının ya da ilacın yapısal bir özellğinden dolayı hedefine ulaşamamasının sonucunda doğal dirençtrep meydana gelir. İlaç dış membrandan geçemediği zaman gram negatif bakteriler vankomisine doğal direnç gösterir.

Mycoplasma'lar gibi çepersiz mikroorganizmalar veya bakterilerin L formları hücre duvar sentezi inhibitörlerine (penisilin vb.) doğal göstermektedir (Yüce, 2001).

Bir bakteri kromozomal ya da kromozomal olmayan nedenlere bağlı genetik özelliklerindeki değişkenlikten dolayı, duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajandan etkilenmezse buna

kazanılmış direnç denir. Genetik kaynaklı direnç olabilir. Bazı fiziksel ve kimyasal nedenlerle oluşabilen spontan mutasyonlar bakteri hücresinde yapısal değişimlere neden olur. Bu sebeple hücre içinde ilacın hedefinde değişiklikler olabileceği gibi hücrenin ilaca permealibitesi de azalabilir (Yüce, 2001).

Enterococcus'lar direnç özelliklerinden dolayı insan sağlığı açısından dikkat çekmektedir. Antibiyotik dirençliliği, hastane ortamında *Enterococcus*'ların canlı kalabilmesinin ve dirençli suşların yayılmasının temel sebebidir.

Doğal direnç polimiksinler, linkomisin, sefalosporinler, aminoglikozitler ve klindamisine karşı oluşur. Kazanılmış direnç ise kloramfenikol, trimetoprim sulfametoksazol, makrolitler, tetrasiklinler, aminoglikozitler, teikoplanin, vankomisin ve ampisiline karşı oluşur. Çoklu antibiyotiğe dirençli *Enterococcus*'larda ampisilin, vankomisin ve gentamisin, klinik alanlarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Son zamanlarda vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) suşlarının sayısında artış olmaktadır (Toğay ve Temiz, 2011).

1980'li yılların sonunda, neden olduğu enfeksiyon güçlükle tedavi edilmiş glikopeptidlere karşı dirençli *Enterococcus* (GRE) tespit edilmiştir (Peters ve ark., 2003). Glikopeptidleri içeren teikoplanin ve vankomisine direnç, gıda kaynaklı *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* arasında sıklıkla görülen ve izole edilen direnç çeşididir. Bu glikopeptidlerin önemi, ampisiline karşı alerjik reaksiyon gösteren insanların klinik tedavisinde kullanılmalarından veya çoklu ilaç direnci gösteren türlerden kaynaklanmaktadır (Giraffa, 2002). Immun sistemi zayıf bireylerde bu antibiyotikler bazı enfeksiyonlara karşı son tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Vankomisine dirençli *Enterococcus*'lar (VRE) bilinçsiz antibiyotik kullanımı ve halkın sağlığı için dünyada etkisini gösteren bir tehdit olarak görülmektedir. VRE'ler çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde ve hastaların tedavisinde vankomisine ihtiyaç duyulduğu zamanlarda olumsuz sonuçlara neden olmaktadır. Bu sebeple hastanelerde ve sağlık

alanlarında vankomisine dirençli *Enterococcus*'ların görülmesi tehdit oluşturmaktadır (Gelsomino ve ark., 2003).

VRE'lerin ilk ortaya çıktığı zamanlarda neden olduğu enfeksiyonlar dünyada önemli bir probleme dönüşerek *Enterococcus*'larda kullanılan bütün antibiyotiklere karşı direnç kazandırmıştır (Eaton ve ark., 2001). Son yıllarda vankomisine dirençli türler arasında *Enterocccus faecium* en sık gözlenen tür olarak belirlenmiştir. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VREF) suşları, insan ve hayvansal kaynaklar, hastane ortamı ve tarımsal ürünlerden izole edilerek yapılan çalışmaların vankomisine yüksek oranda direnç gösteren *E.faecium* türlerinin hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edildiğini göstermiştir (Lukasova ve ark., 2003).

Vankomisine dirençli *E.faecium* suşları, dışkılar, pis sularla (lağım vb.) sulanmış bitkiler ve kesimhane alanlarında kötü hijyen ve sanitasyon koşulları gibi nedenler ve çevresel etmenlerin kontaminasyonu sebebiyle gıdalara bulaşabilmektedir (Giraffa, 2002).

VREF suşları genellikle domzu eti, tavuk eti, biftek vb. et ürünlerinden izole edilmekle beraber kontamine olmuş gıdalar yoluyla VRE'lerin insanlara farklı yollarla transfer olabilmesinin riski tehdit oluşturmaktadır (Gião ve ark., 2022).

Enterococcus cinsi bakteriler genelde düşük virülans özelliği gösterseler de sık rastlanan tür olan *E.faecium* ve *E.faecium* kullanılan antibiyotiklere karşı güçlü direnç göstermeleri sebebiyle, klinik alanda önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Gomes ve ark., 2008).

Pastörize ve çiğ sütlerde, et ürünlerinde, yemeye hazır gıdalarda ve probiyotik kültürlerde antibiyotiğe dirençli *Enterococcus*'ların (ARE) varlığı tespit edilmiş ve direncin gıda zincirine yayılması halinde risk oluşturacağı bildirilmiştir. Fransız peynirleri ve hastanedeki hastalardan alınan klinik örneklerde *Enterococcus faecium*'un kanamisin ve gentamisin antibiyotiklerine yüksek direnç gösterdiği gözlenmiştir (Giraffa, 2002).

Gousa ve ark. (2010) araştırmasında elde ettikleri 428 izolatın 57'sini *Enterococcus* spp. olarak tanımlamış ve çiğ veya işlenmiş etlerdeki bakteri kontaminasyonunu incelemişlerdir. 19 antibiyotik ile antibiyotik dirençliliğini çalışmışlardır. Bu izolatların %42,1'inde yüksek

antibiyotik direnci görülmüştür. %21,1'inin vankomisine karşı dirençli olmasıyla beraber tespit saptanmıştır (Gousia ve ark., 2010).

Tuncer ve ark. (2009) tulum peynirleri ile yaptıkları bu araştırmada izole ettikleri 39 *Enterococcus* izolatının tamanında vankomisin duyarlılığını gözlemlemişlerdir (Tuncer ve ark., 2009).

Lukasova ve ark. (2003) çalışmalarında çiğ süt ve sucuktan *Enterococcus* türleri izole etmiş bu izolatların gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloromfenikol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu saptayarak *E.faecium* ve *E.faecium*'un, *Lactococcus lactis* spp.'ye tetrasiklin direnç genlerini, bu bakterilerin kromozomuna transfer edildiğini tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada Mısır Dominati peynirlerinden izole edilen *E.faecium* suşlarının ampisilin ve amoksisiline duyarlı, okzasilin ve sephazoline karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir (Lukasova ve ark., 2003).

Anderson ve ark. (2016) kırmızı etten izole ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium*'un baskın olduğu çalışmada ve sığır, domuz ve tavuktan baskın izole edilen *E.faecium* türlerinin farklı kökenlerden gelen tüm izolatlarını eritromisine dirençli ancak ampisiline duyarlı, 14 gıda örneğinin 13'ünde ve 15 klinik örneğinin 13'ünde tetrasiklin direncini yaygın bulmuşlardır (Anderson ve ark., 2016).

Semedo ve ark. (2021) çalışmalarında 34 *Enterococcus* izolatında tetrasiklin direncini 14 (%87,5), eritromisin direncini 10 (%55,6) bulmuşlardır. Tetrasiklin ve eritromisinin *Enterococcus*'larda yaygın direnç gösteren antibiyotik olduğunu göstermişlerdir (Semedo ve ark., 2021).

Enterococcus'ların patojenitesi, antibiyotiklere olan dirençleri ve agregasyon materyalleri, hücre duvarı yapışıklılığı, jelatinaz, hücre dışı yüzey proteini gibi virülans faktörleri ile bağlantılıdır (Yu ve ark., 2019).

Biyofilm, ekzopolimerik maddelerin, proteinler ve polisakkaritlerle beraber nükleik asitlerin hidratlı bir matrisine yerleştirilmiş farklı biyotik ve abiyotik yüzeylere güçlü şekilde bağlanmış hücre popülasyonudur (Bollinger ve ark., 2001). Gıdalarda yaygın bulunan iki *Enterococcus* türünden *E.faecium* ve *E.faecium* yüzeylere sağlam şekilde tutunan, bir hücre

popülasyonundan oluşan biyofilmleri üretebilir (Mohamed ve Huang, 2007). Biyofilmlerin ortadan kaldırılmaları çok zor olduğu içinmhalk sağlığında birçok kronik enfeksiyonun nedenidir (Lewis, 2001). Biyofilmlerdeki *Enterococcus*'larda biyofilm oluşumunun potansiyel etkisi önemlidir ve *Enterococcus*'ların planktonik olarak büyüyenlerine göre antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (Mohamed ve Huang, 2007).

2.4. *Enterococcus* Türlerinin Virülans Faktörleri

Hemolizinler, insan, sığır, tavşan ve at eritrositlerini hemoliz ederek özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında bulunarak virülans özellik kazandırmada rol oynar. Hemolizinler aynı zamanda toksik etkilerinden dolayı birçok gram pozitif bakteriye olumsuz etki eden bakteriyosin olarak da işlev gördüğü tespit edilmiştir. Diğer olumsuz etkilerinin arasında direkt doku harabiyeti ve immun sistem üzerindeki lökositlere zarar verici ve olumsuz etkisinin olduğu gösterilmiştir (Sayıner ve ark., 2008).

Jelatinaz, gıdalardaki *E.faecium* suşlarında jelatini ve kollajeni hidrolize eden bir hücre dışı enzim olmakla birlikte çalışmalarda fenotipte bu özelliği göstermemesi ancak genotipte jelatinaz geninin bulunmasına karşılık jelatinaz varlığının sonucunda değişkenlik gösterebilmektedir. Hücre dışı yüzey proteinlerinin konakçı bağışıklık sisteminin korunmasında rol oynamasının yanında adhezyonda da yardımcı olduğu düşünülmektedir.

Patojenler, konakçı dokudaki hücrenin dışında bulunan matrikse tutundukları zaman enfeksiyona neden olabilmektedir. Besinler aracılığı ile vücuda giren yağların yapı taşlarına kadar parçalanmasını ve vücutta kullanılabilir hale getirilmesini sağlayan enzim lipazdır. Lipaz sayesinde vücuda alınan yağların emilime hazır hale gelmesi, bu yağları yağ asitleri ve gliserole dönüştürmesiyle gerçekleştirilir. Lipazlar gıdalarda bozunmaya neden olurlar. *Enterococcus*'lar lipaza zayıf veya negatif aktivite gösterirler (Yu ve ark., 2019).

DNA'yı kısa oligonükleotit parçalarına ayıran ve DNA'daki fosfodiester bağlarını kesen bir enzim olan DNAz *E.faecium* ve *E.faecium* türlerinde DNA bozunmasına neden olurlar. Yapısında protein ve glukoprotein olan S tabakası, hücre zarfının bir parçasıdır ve *Enterococcus* türlerinde S-tabakası dış membran olmadığından peptidoglikan tabakaya bağlıdır. S-tabakası, hücreleri ozmotik basınç, yabancı enzimler, iyon ve pH değişimlerinden korur ve bazı zarfın sağlamlığını sağlarken bakteri hücrelerinde şeklin oluşumunda rol

oynar. S tabakası oluşumu *Enterococcus* türlerinin çoğunda yaygındır ve çalışmalarda pozitif sonuç verir (Igbinosa ve ark., 2020).

Feromonlar, *Enterococcus*'lar tarafından sentezlenen plazmid DNA'nın konjugasyonunu denetleyen, enfeksiyonlarda inflamatuar cevabı artıran küçük peptitlerdir (Sayıner ve ark., 2008).

Ekstraselüler yüzey proteini, moleküle uzayıp kısalabilme özelliği kazandırır. Aynı zamanda karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı sağlayan, proteinin iç kısmında tekrarlayan ünitelerden oluşur. İlk kez *E. faecalis* türlerinde görülen bu yüzey proteinleri, büyük yüzey proteininin kompleks formda yapılanmasıdır (Sayıner ve ark., 2008).

Hiyalüronidaz, *Enterococcus*'larda bağ dokuda bulunan mukopolisakkaritlerin bir kısmını depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar ve hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açar. Aynı zamanda hyaluronik asidin degradasyon ürünü olan bakteriler için besin kaynağı olan disakkaritler olan hyaluronidaz, zarar veren etkilerinin yanı sıra, diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini güçlendirerek şiddetli doku hasarına neden olur (Fabretti, 2006).

Enterococcus'lar, antimikrobiyel direnç ve taşıyıcıya adapte olabilme yeteneğine sahip virülans özellikler bulundurabilirler. Bu türler, genetik materyallerini değişime uğratabilmeleri ve genetik bilgilerini başka türlere aktarabilmelerinden dolayı, mevcut genomda degişikliğe neden olamakta veya genetik materyallerini plazmidler aracılığıyla hücreler arasında taşınmasına sebep olmaktadır. Böylece bu organizmalar virülans faktör bulundurmazken bile zararsız bir bakterinin patojen etki göstermesine neden olmaktadır (De Vuyst ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar klinik *Enterococcus* türlerindeki transfer olayının gıda kaynaklı veya probiyotik türlere göre daha başarılı olduğunu göstermiştir (Klein, 2003).

Yapılan araştırmalar klinik örneklerdeki *Enterococcus* türlerinin, gıda kaynaklı türlere göre daha fazla virülans faktör taşıdığını ve klinik izolatların starter kültür olarak kullanılan *Enterococcus* türlerine göre daha yüksek patojeniteye sahip olduğunu göstermektedir (Franz ve ark., 2003).

Gıdalardan izole edilen *E.faecium* türleri genelde yüksek oranda virülans faktör tehditi oluşturmamaktadır. Ancak zararsız olarak bilinen bir suşun konjugasyon yoluyla virülans faktörlerini aktarabilmesi riski vardır. Starter kültür veya probiyotik olarak *Enterococcus* kullanılması ve tüketilmesi sonucunda, virülans gen taşıyan plazmidlerin yayılabileceği öngörülmektedir. Gıdalarda bulunan *E.faecium* ve *E.faecium*'un antibiyotik direnç özelliğine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu yüzden antimikrobiyel dirençli *E.faecium* türleri bulunduran gıdaların tüketimi, taşıyıcıda direnç determinantlarının oluşmasına ve kolonizasyonuna neden olabilir (Hayes ve ark., 2003).

Fermente gıdaların yapımında kullanılan, bakteriyosin üretebilen veya starter, koruyucu veya probiyotik olarak kullanılan suşların güvenliği suş ile ilgili olmakla birlikte virülans faktörlerin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır. Günümüzde *Enterococcus*'ların henüz güvenilir olarak kabul edilmediğinden starter kültür olarak kullanılmalarının uygun olup olmadığına verilecek net bir cevap yoktur. *Enterococcus* türlerinin gıda kontaminasyonuna sebep olması veya klinik olaylara yol açması bu bakterilerin fermentasyon işleminde ve probiyotik olarak kullanılmaları günümüzde hala soru işaretleri bırakmaktadır (Nováková ve ark., 2010).

Barbosa ve ark. (2010), geleneksel fermente etleri ile Kuzey Portekiz ülkesinde yapmış olduğu bir çalışmada 76 *Enterococcus* izolatı elde ederek bu izolatlarda 13 farklı virülans gen tespit etmiş ve 3 (%3,9) tanesinde esp, 52 (%69,3) tanesinde gelE geni bulmuşlardır. Fenotipte %26,4 jelatinaz aktivitesi bulmuşlardır. *Enterococcus*'ların jelatinaz aktivitesinin hem fenotip hem de gentotipte varlığını göstermişlerdir. *Enterococcus* türlerinin virülans özelliklerinden dolayı gizli ve tehlikeli patojen olabileceğini tespit etmişlerdir (Barbosa ve ark., 2010).

Medeiros ve ark. çalışmasında gıda izolatlarının %56,4'ünde biyofilm oluşumu, klinik örneklerinin %74,2'sinde hemolitik aktivite, %77,7 oranında gelE ve %34,8 oranında esp geni gözlemlemişlerdir. Biyofilm oluşumu ve virülans genlerinin *Enterococcus* türlerinde hem gıda alanında hem de klinik alanında sıkça rastlanması gıda ve sağlık alanında endişelere yol açmaktadır (Medeiros ve ark., 2014).

Camargo ve ark. (2014) çalışmasında, 105 gıda örneğinin %95,2'sinden elde ettikleri *Enterococcus* türlerinde patojenite; biyofilm üretimi, hücre dışı proteazlar (kolagenazlar,

jelatinaz), sitolizinler (bakteriosinler ve hemolizinler), hücre duvarı yapışıklığı ve cinsiyet feromonları gibi çeşitli faktörlerle ilişkilendirilmiştir (Jett ve diğerleri, 1994; Eaton ve Gasson, 2001). *E. faecalis* ve *E.faecium*'da deneysel modellerde hemolizin üretimi ve jelatinazın varlığı virülans ile ilişkili görünmektedir. Bu sebeple virülans belirticilerinin gıdalarda endişe kaynağı olacağını vurgulamışlardır (Camargo ve ark., 2014).

Anderson ve ark. (2016) oral, gıda ve klinik kaynaklı 97 *E. faecalis* izolatlarının tamamında efaA, %99'unda gelE, %70,5'inde esp tespit etmiş olup hiçbir izolatta hyl genine rastlamamışlardır. Örneklerin %3,3'ünde jelatinaz aktivitesi, klinik izolatların %46,6'sında, gıda izolatlarının %13,3'ünde hemolitik aktivite görülmüştür. Starter kültür olarak kullanılan *E.faecium* suşlarının gıda kontaminantlarına ve ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olabileceğini tespit etmişlerdir. Çoklu virülans genlerine sahip izolatların gen kalıpları ve bunların tümü ile biyofilm oluşturma yeteneklerinin karakteristik farklılıklar göstereceğini belirtmişlerdir (Anderson ve ark., 2016).

Igbinosa ve Beshiru (2019) hazır deniz mahsullerinden (soslu, haşlanmış ve füme karides) elde ettikleri 17 (%28,8) *E.faecium* ve 29 (%49,2) *E.faecium* türünden gelE'yi 18 (%30,5), cpd'yi 36 (%61), ccf'yi 56 (%94,9), efaA'yı 46 (%77,9), esp'yi 58 (%98,3) ve hyl'yi 44 (%74,6) oranında ve biyofilm oluşumunu tespit ederek *Enterococcus*'lardaki virülansı çeşitliliğe bağlamıştır (Igbinosa ve Beshiru, 2019).

Golob ve ark. (2019) perakende kırmızı etten ve insanlardan alınan klinik örneklerden elde ettikleri 51 *E.faecium* ve 191 *E.faecium* izolatında baktıkları virülans genlerden kırmızı ette; *E.faecium*'te 115 (%95,8) efaA, 13 (%10,8) esp, 79 (%65,8) gelE tespit ederken hyl genini hiç saptamamışlardır. *E.faecium* türlerinin hiçbirinde efaA, esp, gelE, hyl genleri tespit edilmemiştir. Klinik örneklerden; *E.faecium*'te 69 (%97,2) efaA, 51 (%71,8) esp, 63 (%88,7) gelE, 2 (%2,8) hyl tespit ederken *E.faecium*'da 4 (%13,3) efaA, 21 (%70) esp, 2 (%6,7) gelE, 16 (%53,3) hyl geni saptamaları, *Enterococcus*'ların virülans genlerinin gıda ve klinik örneklerde yetersiz hijyen koşullarında veya virülans genlerin kuvvetli aktivitesi sonucu gıdada ve halk sağlığında tehdit oluşturduğunu göstermiştir (Golob ve ark., 2019).

Semedo ve ark. (2021) çalışmalarında hemolitik aktiviteyi 10 *E.faecium* izolatının 6'sında (%60) bulurken *E.faecium* izolatlarında tespit etmişlerdir. Jelatinaz aktivitesini 11 *E.faecium* izolatının 9'unda (%81,8), 10 *E.faecium* izolatının 6'sında (%60) gözlemlemişlerdir. 10

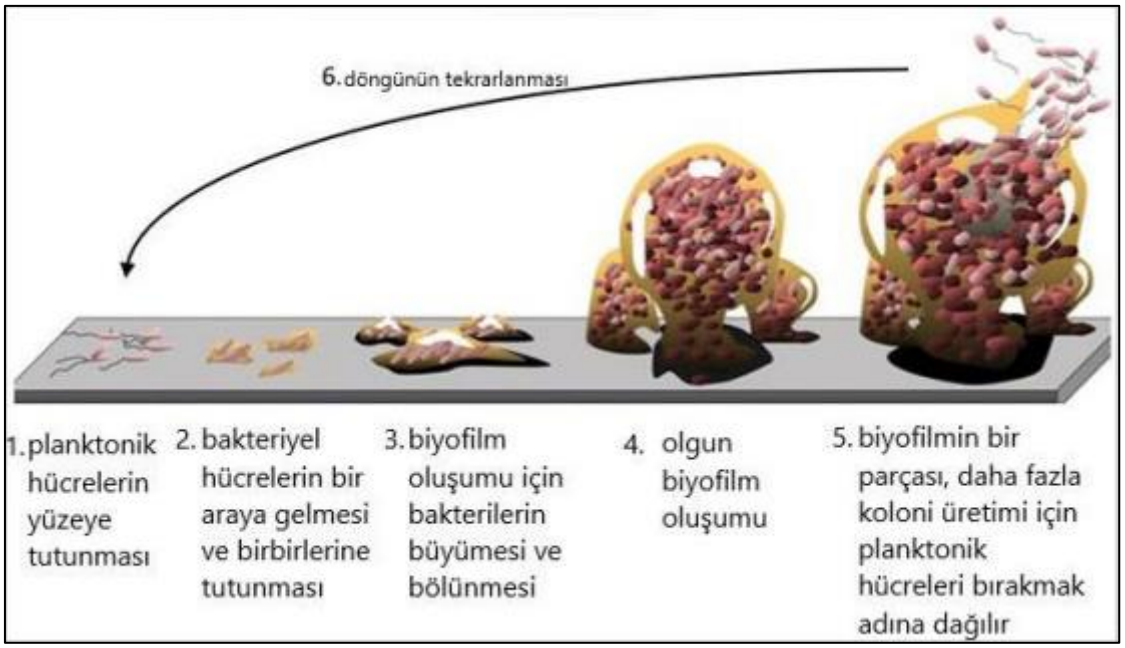
E.faecium izolatında 7 (%70), 10 *E.faecium* izolatının tamamında gelE tespit etmeleri ve hiçbir izolatta esp geni gözlemlememeleri virülans genlerin *E.faecium* ve *E.faecium* türlerinde yaygın olduğunu göstermiştir (Semedo ve ark., 2021).

El-Zamkan ve Mohamed (2021) mastitisli koyun sütü ve keçi sütünden elde ettikleri *Enterococcus* izolatlarından gelE (78,4%), esp (32,4%) oranında tespit ederek hyl genini hiç gözlemlemişlerdir. Dünyanın farklı yerlerinde gıdalarla yapılan *Enterococcus* çalışmalarında virülans genlerin baskın şekilde ortaya çıktığı *Enterococcus*'ların virülans karakter açısından gıdada ve insan sağlığında sorunlar teşkil edeceğini gözler önüne sermiştir (El-Zamkan ve Mohamed, 2021).

2.5. *Enterococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşturma

Bazı bakteriler doğal veya abiyotik yüzeylerle ilişkili olarak serbest hücreler yerine, mikroorganizmalar için yaygın bir büyüme şekli olan, yüzeylerde oluşan ve doğada bulunan bir ekzopolimerik manto içinde bulunan mikroorganizmaların ortak yapıları olan biyofilm formunda büyümeyi tercih etmektedir. Biyofilmlerdeki bakteri hücreleri sahip oldukları farklı mekanizmalar sayesinde antibiyotiklere karşı artan direnç gösterirler. Bu mekanizmalar; hücre dışı polimerik matriks yüzünden biyofilmde yüksek bakteri konsantrasyonu olması, aktif moleküllerin biyofilm boyunca difüzyonunun azaltılması, fizyolojik yapının modifiye olması: azalan metabolizma ve büyüme hızı, porin sentezinin azalış göstermesi, antimikrobiyal bileşikleri parçalayan enzimlerin aşırı üretimi, çok ilaca direnç operonlarının veya efluks pompalarının indüksiyonu ve pasifleşmedir (Capita ve Alonso-Calleja, 2013).

Mikrobiyal hücreler uygun koşullar altında, kendi yetenekleri sayesinde ürettikleri hücre dışı polisakkarit sayesinde yüzeylere kolayca tutunabilir. Hücreler çoğaldığında, biyofilm hücredışı polimerik yapı yüzeyde mikrobiyal hücre topluluğunu içeren, ekzopolisakkarit yapı polisakkarit-glikokaliks, proteinler, fosfolipitler, teikoik ve nükleik asitlerden oluşan üç boyutlu iskele bir yapı oluşturur (Koneman ve ark., 1997).



Resim 2.1. Bakterilerin biyofilm oluşturma mekanizması

Immun sistemin sahip olduğu doğal mekanizmaların etkisinden korunmak için bakteriler, bakterinin makrofajlar tarafından inhibe edilmesini önleyen biyofilm tabakasını oluşturur. Bakterilerin fagosite edilmelerini güçleştiren ve bağışıklık sistemi hücrelerinin bakterilere ulaşmalarını engelleyen durum gruplar halinde polisakkarit matriks içinde bulunmalarıdır. Bu sebeple biyofilm tabakasının özelliklerinin kronik enfeksiyonlara neden olduğu öne sürülmektedir. Biyofilm tabakası üreten mikroorganizmalar dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı oldukça dirençlidir. Biyofilm, birçok bakteri türüne antibiyotik direnci kazandırabildiği gibi antibiyotiklerin girişini engelleyici özelliğe de sahiptir (Flemming and Wingender, 2010).

Anderson ve ark. (2016) kırmızı etten izole ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının %60'ının biyofilm yapmadığını ve çoğu klinik izolatın %73,3 orta veya yüksek biyofilm oluşumuna sahip olduğunu gözlemlemişlerdir Ayrıca oral izolatlarının %64,9 orta ve %5,4 yüksek oranda biyofilm üreticisi olduğu kanıtlanmıştır. Toplamda test edilen izolatların %54,7'si orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu, %11,6'sı yüksek biyofilm üreticisi olduğunu ve %33,7'sinin hiç biyofilm üretmediğini tespit edip biyofilm oluşumunun gıda ve klinik alanlarında antibiyotik direnci kazandırdığını görmüşlerdir (Anderson ve ark., 2016).

Igbinosa ve Beshiru (2019) hazır deniz mahsullerinden (soslu, haşlanmış ve füme karides) elde ettikleri 17 (%28,8) *E.faecium* ve 29 (%49,2) *E.faecium* türünden 19'u (%32) hiç, 11'i (%19) zayıf, 22'si (%37) orta ve 7'si (%12) biyofilm oluşturmak üzere genel olarak, 40'ının (%67,8) biyofilm oluşturduğunu gözlemlemiş ve biyofilm oluşumunun *Enterococcus* türlerinde virülans etken olduğunu belirtmişlerdir (Igbinosa ve Beshiru, 2019).

El-Zamkan ve Mohamed (2021) mastitisli koyun sütü ve keçi sütünden *E. faecalis* sırasıyla %30 ve %28,9 oranında, *E. faecium* sırasıyla %26,7 ve %10,5 izole edilmiş ve bu izolatların %73'ü farklı seviyelerde biyofilm oluşturabildiği görülmüştür. 24 saat inkübasyondan sonra 7 (%18,9) *Enterococcus* suşu güçlü biyofilm oluştururken, 12'si (%32,4) orta ve 8'i (%21,6) zayıf biyofilm oluşturmuştur. *E. faecalis* izolatları, orta ve güçlü biyofilmin %44'üne katkıda bulunmuştur. *E.faecium* suşları başta olmak üzere *Enterococcus* türlerinde önemli bir kaynak olan biyofilmlerin gıda işleme sektöründe kontaminasyonun bir sonucu olduğunu ve enterokok enfeksiyonunun patojenitesinde etkili olduğu görülmüştür (El-Zamkan ve Mohamed 2021).

Ayrıca bu çalışma ile uyumlu olarak Elhadidy ve Zahran yaptıkları çalışmada subklinik mastitis ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ve meme bezi epiteline yapışması arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir; 38 biyofilm oluşturan *E. faecalis*'in 18'inin klinik ve subklinik mastitik sütten izole ettiklerini, biyofilm aktivitesinin gıdalarda olduğu kadar klinik alanlarda da önemli bir yerinin olduğu gösterilmiştir. *E.faecium*'in çeşitli antimikrobiyallere karşı sergilediği doğal direnc ek olarak, biyofilm bu terapötik ajanlara karşı direncini de arttırır. Bu nedenle, direnç genlerinin yayılması için bir rezervuar olarak kabul edilir, bu da *E. faecalis* biyofilmi ile ilişkili enfeksiyonları klinik bir tehdit haline getirir ve tedavi edilmesi son derece zor hale gelir. Biyofilm oluşumu, ulusal ve uluslararası yapılan çalışmalarla gıda ve sağlık alanını tehdit ettiğini göstermiştir (Elhadidy ve Zahran, 2014).

3. MATERYAL-METOD

3.1. Gıda Örneklerinin Toplanması

Araştırmamızda Eylül–Aralık 2020 tarihlerinde, Ankara ilinde bulunan pazar, market, çiftlikte satışa sunulan çiğ süt, peynir, çiğ tavuk, çiğ et örneği her birinden 20 adet olmak üzere toplam 80 gıda örneği materyal olarak kullanılmıştır. Çalışılan örneklerden *Enterococcus*'ların tür seviyesindeki tanımlamaları Becton Dickinson (BD) BBL Crystal Identification Systems ve Enteric/Nonfermenter ID Kit ile ve MALDI-TOF MS (Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu) yapılmıştır. Tanımlamaları yapılan *Enterococcus* türlerinde virülans faktörü olarak efaA (hücre duvarı yapışkanlığı), gelE (jelatinaz), Esp (enterokok yüzey proteini), cpd (cinsiyet feromonu), ccf (cinsiyet feromonu), hyl (hiyaluronidaz) araştırılmıştır. *Enterococcus* izolatlarında antibiyotik duyarlılığı Clinical and Laboratory Standarts Instute (CLSI)'da belirtilen kriterlere göre Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır (CLSI, 2015) ve biyofilm oluşumu Kongo Red Agar ve mikroplate yöntemiyle araştırılmıştır.

3.1.1. Örneklerin alınması ve analize hazırlanması

Araştırmamızda gıda örnekleri (et ve süt ürünleri) Türk Standartları Enstitüsünde (TSE, 2011) bildirilen kurallara göre toplanmıştır. Süt örnekleri koyu renkli, steril ve cam şişelerde; peynir ve et örnekleri de tat ve kokularında olumsuz durum oluşturmayacak ve örneklerin ağırlığını etkilemeyecek steril kaplarda muhafaza edilmiş ve uygun sıcaklık koşullarında laboratuvar ortamına getirilerek kontaminasyona sebebiyet vermemek için aynı gün içerisinde çalışılmıştır (Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, 2011).

3.1.2. Çiğ süt örneklerinin analize hazırlanması

Satın alınan çiğ süt örneklerinden 5 ml steril pipet ile alınmış ve 45 ml'lik Peptone Water ile homojenize edildikten sonra Peptone Water'da 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} oranlarında dilue edilmiştir. Dilusyonlardan 0,1 ml alınarak Slanetz Bartley Agar (SBA) besiyerine steril drigalski ile ekimleri 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kırmızı ve pembe renkteki *Enterococcus* şüpheli koloniler *Enterococcus* izolasyonu için SBA besiyerinde stoklanmıştır.

3.1.3. Peynir ve et örneklerinin analize hazırlanması

Steril numune kaplarında beyaz peynir ve et örnekleri, analiz için en uygun zamanda laboratuvara getirilmiştir. Peynir ve et örneklerinden bistüri yardımıyla 5 gr. tartılıp, 15.000-20.000 devir/dakika hızla stomacher ile parçalanarak 45 ml Peptone Water ile homojenize edilerek Peptone Water'da 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} oranlarında dilue edilmiştir. Et ve süt ürünlerine ait örneklerin 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} oranlarındaki dilusyonlarından 0,1 ml alınarak Slanetz Bartley Agar'a steril drigalski ile ekimleri yapılmış 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kırmızı ve pembe renkteki *Enterococcus* şüpheli koloniler *Enterococcus* izolasyonu için SBA besiyerinde stoklanmıştır.

3.2. Gıda Örneklerinden *Enterococcus* İzolatlarının Tür Tanımlaması

Kültürel yöntemlere göre izolatların ön tanımlaması SBA'da üreme gösteren kırmızı ve pembe renkteki koloniler gram boyama yöntemi esas alınarak boyanmış Gr (+) kok özellik gösteren izolatlara katalaz, oksidaz, eskülin hidroliz, %6,5'luk NaCl'de üreme uygulanmıştır. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de (1989) belirtilen esaslara göre biyokimyasal testler sonucunda ön tanımlaması yapılan 60 *Enterococcus* izolatının tür tayini Crystal Gram Positive Kit (BD BBL) ve Sağlık Bakanlığı'nın Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı'nda MALDI-TOF MS kütle spektrometrisi (Matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon) ile yapılmıştır. Araştırmamızda pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır.

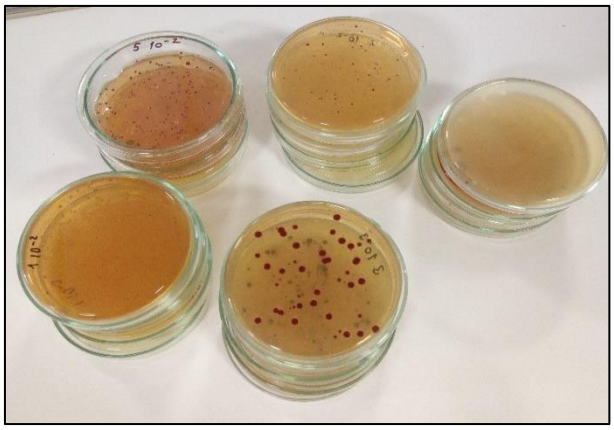
3.3. Gıda örneklerinde *Enterococcus* İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Testler

3.3.1. Peptonlu su (Oxoid CM 9)

15 dakika 121^0C otoklavdan çıkarılan besiyerleri cam tüplere enjektör yardımıyla 5 ml dağıtılmıştır.

3.3.2. Slanetz bartley agar (LAB 166)

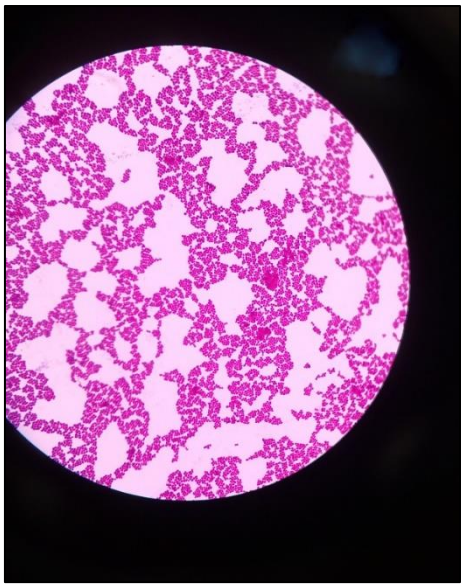
Bek alevinde homojen şekilde dağılması için eritilen besiyeri petri kaplarına 10 ml dökülmüştür.



Resim 3.1. Slanetz Bartley Agar'da üreme gösteren *Enterococcus* türleri (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.3.3. Gram boyama yöntemi

Gram boyama yöntemi ile kristal violet ve safranin boyaları kullanılarak boyanan preparatlardan, kok ve zincir şeklinde üreyen gram pozitif (+) koloniler incelenmiştir.

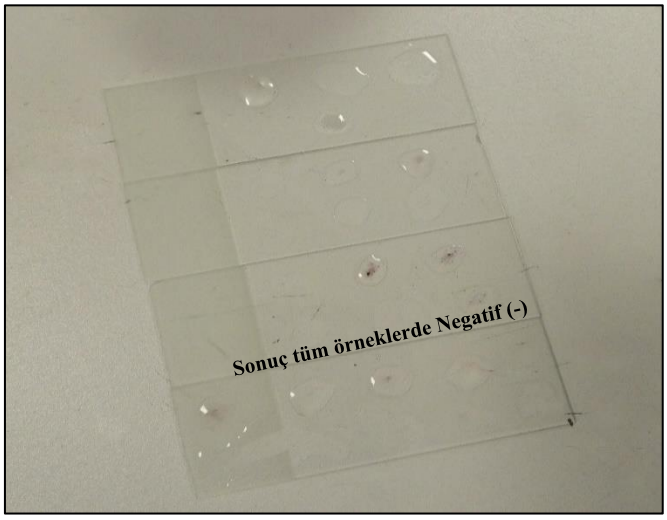


Resim 3.2. *Enterococcus* türlerinin Gram boyama sonrası mikroskop görüntüsü (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.3.4. Katalaz testi

Üreme gösteren bakteriler temiz bir lam üzerinde serum fizyolojik içinde süspanse edilerek üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılmıştır. Kabarcıklarının tükürük şeklinde

görülmesi durumunda test pozitif değerlendirilmiştir. Katalaz negatif değerlendirilen koloniler *Enterococcus* olarak tanımlanmıştır.



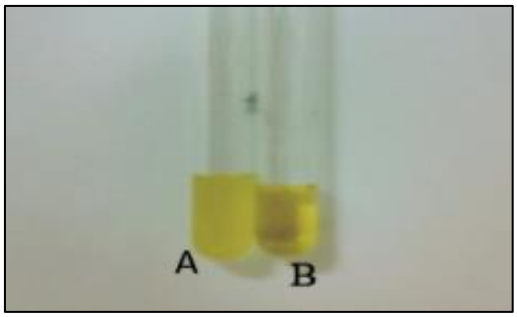
Resim 3.3. *Enterococcus* türlerinde katalaz testi (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.3.5. Oksidaz testi

N, N-dimetil p-fenilendiamin dihidrokloridin %1'lik çözelti hazırlanmış ve kurutma kağıdına emdirilmiştir. *Enterococcus* kolonileri öze ile kurutma kağıdının üzerine alınarak 5-10 saniye sonra renk vermeyen koloniler negatif, mavi renk oluşturan koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, *Enterococcus*'lar oksidaz negatif oldukları için negatif örnekler değerlendirilmiştir.

3.3.6. %6,5'luk NaCl'de üreme

37 g Brain heart infusion broth ve 60 g NaCl, 100 ml su içerisinde çözdürülüp tüplere 5 ml pipetlendikten sonra tüpler pamuklanmış ve otoklavda 121^0C'de 15 dakika steril edilmiştir. %6,5'luk NaCl'lu buyyon içerikli cam tüplere birkaç koloni inoküle edilerek 37^0C de 24-72 saat inkübe edilmiş ve buyyonda bulanıklığın görülmesi *Enterococcus*'larda testin pozitif olduğunu göstermiştir.

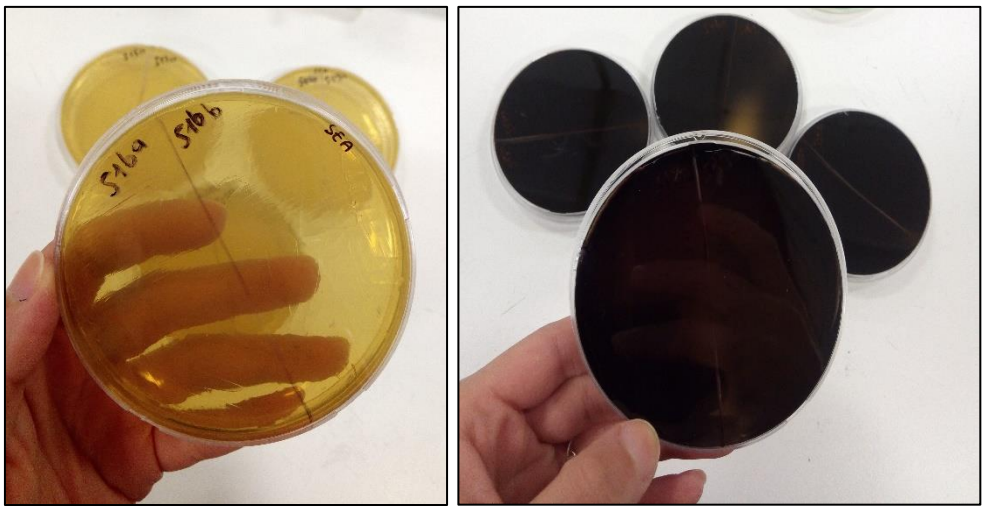


A: 10^0C'de ve 45^0C'de Üreme üreme pozitif B: 10^0C'de ve 45^0C'de üreme negatif

Resim 3.4. 10^0C'de ve 45^0C'de üreme testi (Fotoğraf Ayşegül Ayva'nın Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen *Enterococcus* suşlarında Antibiyotik Direncinin Değerlendirilmesi tezinden alınmıştır)

3.3.7. Eskülin hidrolizi

Safra eskülin agar (Merck 1.00072) besiyeri tartılarak 1000 ml distile suda çözdürülmüş ve otoklavda 121^0C'de 15 dakika steril edilerek petri kaplarına dökülmüştür. Bakteri kolonilerinin ekimi yapılarak 24-48 saat inkübe edilmiştir. Besiyerinin yüzeyinin siyah renge dönüşümü eskülin hidroliz testinin pozitif sonuç verdiğini göstermiştir.

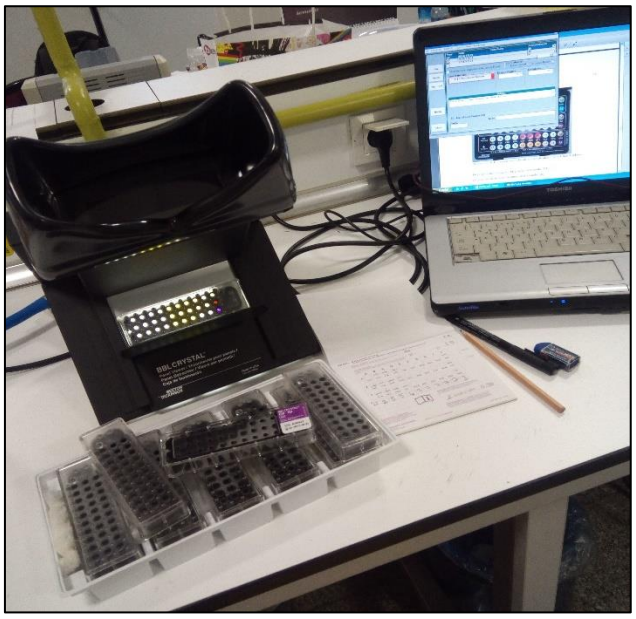


Resim 3.5. Eskülin hidroliz testinin 24-48 saat inkübasyondan sonra (+) sonucu (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.4. *Enterococcus* İzolatlarının Tür Seviyesinde Tanımlanmasının Doğrulanması

Enterococcus cinsine ait izolatların Becton Dickinson (BD) BBL Crystal Identification Systems ve Gram-Positive ID kit ile tür seviyesindeki tanımlamaları doğrulanmıştır. Tryptic

Soy Agar (Merck 105458) besiyerine tek koloni ekimi yapılan izolatlar, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra üreyen *Enterococcus* kültürleri, tanımlama kitlerine ait solüsyonlara 0,5 MacFarland bulanıklığına uygun şekilde ekilip, solüsyonun tamamı kit paneline aktarılmıştır. 18-24 saat ve 35-37°C'de inkübe edilen paneller, BBL Crystal Panel Viewer cihazı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları BBL Crystal Identification System programına göre bilgisayar ortamında yapılarak *Enterococcus* türleri tanımlanmıştır.



Resim 3.6. BBL tanımlama cihazı (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.5. İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

Enterococcus spp. izolatlarının antibiyotik dirençliliği Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015) kurallarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. *Enterococcus* türleri Mueller Hinton Agar besiyerine ekilip 30-35ºC'de 24 saat inkübe edildikten sonra, 0,5 Macfarland bulanıklık standardına uygun serum fizyolojik içinde kültürlerden 2-3 koloni süspanse edilmiştir. Steril eküvyon çubuk ile alınarak *Enterococcus* türleri Mueller Hinton besiyerine ekilmiştir. Antibiyotik diskleri pens yardımıyla besiyerine yerleştirilerek 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan zon çapları cetvel yardımıyla ölçülerek CLSI'da (CLSI,2015) belirtilen standartlara göre bu türlerin kullanılan antibiyotiklere duyarlı veya dirençli olduğunun tespiti yapılmıştır. Bioanalysé (OXOID) marka kullanılan antibiyotikler; tetrasiklin (30 mcg), siprofloksasin (10 mcg), norfloksasin (10 mcg) kloramfenikol (30 mcg), streptomisin (30 mcg), ampisilin (10 mcg), vankomisin

(30 mcg), ve teikoplanin (30 mcg), eritromisin (15 mcg), kanamisin (30 mcg), gentamisin (10 mcg), ve amoksisilin klavulonik asit (30 mcg)'dir (CLSI, 2015).

Çizelge 3.1. EUCAST 2015'e göre *Enterococcus*'larda araştırmamızda kullanılan antibiyotik diskleri ve duyarlılık sınırları

Antibiyotikler	Antibiyotik konsantrasyonu (µg)	Zon çapı (mm)	
		Duyarlı	Dirençli
Gentamisin	10 µg	≥ 10	≤ 6
Tetrasiklin	30 µg	≥ 19	≤ 14
Eritromisin	15 µg	≥ 23	≤ 13
Kloramfenikol	30 µg	≥ 18	≤ 12
Streptomisin	30 µg	≥ 10	≤ 6
Ampisilin	10 µg	≥ 17	≤ 16
Vankomisin	30 µg	≥ 17	≤ 14
Siprofloksasin	10 µg	≥ 21	≤ 15
Norfloksasin	10 µg	≥ 17	≤12
Teikoplanin	30 µg	≥ 14	≤ 10
Kanamisin	30 µg	≥11	≤6
Amoksisilin Klavulonik Asit	30 µg	≥20	≤10

3.5.1. Mueller Hinton Agar (LabM 39)

Antibiyogram testi için kullanılmıştır. 38 gramı 1 litre distile suda çözdürülüp, otoklavda 121ºC'de 15 dakika steril edilmiştir.

Serum fizyolojik (SF)

Bileşimi: gr/l
Sodyum klorür: 8,75gr

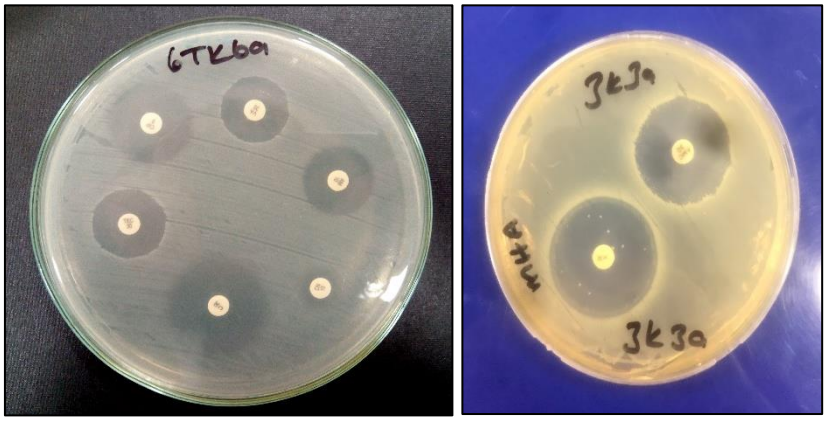
1000 ml su içerisinde 8,75 gramı çözdürülüp 121ºC'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Mc Farland bulanıklılık tüpü

0,5 McFarland standardına uygun bulanıklık tüpü hazırlamak için;

0,048 M BaCI2 (%1,175 g BaCI22H2O) 0,5ml
+ 0,18 M H2SO4/H2O (%1 v/v) 99,5 ml
0,5 Mc Farland = 10 cfu/ml

Baryum klorür ve sülfirik asit kullanılarak hazırlanan bu solüsyon deney tüplerine 5'er ml ilave edilerek oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.



Resim 3.7. Antibiyotik duyarlılık testi (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.6. *Enterococcus* İzolatlarının Fenotipik Virülans Karakterlerinin Belirlenmesi

Crystal Gram Positive Kit (BD BBL) ve MALDI-TOF MS kütle spektrometrisi ile tür tayini yapılan 60 *Enterococcus* izolatının virülans karakterlerinden hemoliz, lipaz, jelatinaz, dnaz, s-tabakası varlığı ve biyofilm oluşumuna bakılmıştır.

3.6.1. Hemolitik aktivite

Koyun Kanlı Agar'da 37ºC'de inkübe edilen ve 24 saat bekletilen bakterilerin üremesi sonucunda hemolitik aktivite çevresinde eritrositlerin parçalanarak hemoliz zon oluşturması durumuna göre pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir (Semedo ve ark., 2003).

Blood Agar base (Oxoid CM 331)

Besiyeri gerekli miktarda tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözdürülüp otoklavda 121^0C de 15 dakika steril edilmiştir. Homojenize olması için 45-50^0C'ye kadar soğutulan bu besiyeri üzerine %5'lik koyun kanı ilave edilerek steril petri kaplarına 10 ml dağıtılmıştır.

3.6.2. Lipaz aktivitesi

Tributyrin Agar besiyeri kullanılarak 25-30ºC'da 2-3 gün inkübe edilmiştir. Besiyeri bileşimindeki tribütirin bulanıklığının şeffaflaşıp şeffaflaşmadığı incelenmiştir (Jeong ve ark., 2015).

Tributyrin Agar (Merck VM461557)

121^0C'de 15 dakika steril edilip hızla karıştırılan besiyeri üzerine 10 ml Tributyrin ilave edilir. Besiyeri bileşimine ilave edilen tribütirinin bulanıklığa neden olması pozitif olarak incelenmiştir.

3.6.3. Jelatinaz aktivitesi

Cam tüpler içerisine 5 ml alınan jelatin besiyeri (Nutrient Gelatine) içerisinde yapılmıştır. Öze ile sıvı besiyerinden alınan bakteri örneği jelatin besiyerine daldırma yöntemi ile ekilerek 37°C'de 10-30 gün arasında inkübe edilmiştir (Kanemitsu ve ark., 2001).

Nutrient jelatin besiyeri (BD DIFCO 211100)

Besiyerindeki maddeler tartılmış ve 1000 ml distile su içerisinde eritilip tüplere 5 ml aktarıldıktan sonra pamuklanarak pH 6.8±0,2'ye ayarlanıp otoklavda 121^0C'de 15-20 dakika steril edilmiştir. Buzdolabında katılaştıktan sonra tüplere ekim yapılmıştır. Jelatinin hidrolize edilmesi bakter,i kültürü buzdolabından çıkarılınca, jelatinli ortamın sıvı halinde ve katılaşmaması pozitif olarak değerlendirilmiştir. Negatif durumlarda tüpteki sıvı jelatinli besi yeri katılaşır.

3.6.4. DNAz aktivitesi

DNaz Agar besiyerine ekim yapıldıktan sonra üreyen bakterilerin üzerine %8.3'lük HCl damlatılarak bakterilerin etrafında şeffaf bir zon görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Omar ve ark., 2004).

Dnase Agar (OXOID CM0321)

1000 ml su içerisinde çözdürülen besiyeri 15 dakika 121^0C'de otoklavda steril edilmiştir.

3.6.5. Yüzey tabakasının (S-tabakası) varlığı

0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue R 250 ilave edilmiş TSA besiyeri üzerinde üreyen bakterilerin besiyerindeki proteinleri parçalaması sonucu kolonilerin üremesinin koyu mavi renkte olduğu gözlemlenmiştir (Bernoth, 1990).



Resim 3.8. *Enterococcus*'ların TSA-C'de üremesi (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

Tryptic Soy Agar (Merck 105458)

1000 ml su içerisinde 37 gr besiyeri çözdürülüp 121ºC'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Besiyeri soğutulduktan sonra üzerine 0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue eklenmiştir.

3.7. Biyofilm Oluşumu

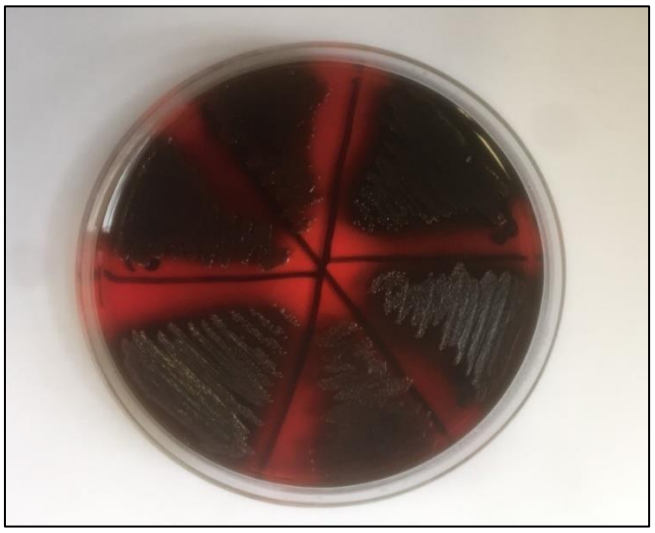
Biyofilm oluşumu steril petri kaplarında Kongo Red Agar yöntemi ve 96 kuyucuklu Mikroplak Yöntemi ile yapılmıştır (Fallah ve ark., 2017).

3.7.1. Kongo Red Agar yöntemi

Suşların kongo red agara ekimi yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, kırmızı veya pembe renkli koloniler biyofilm negatif, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir. Kolonilerin koyu veya açık olma durumuna göre sonuçlar +, ++, +++ şeklinde değerlendirilmiştir.

Kongo Red Agar (Sigma-Aldrich)

1000 ml su içerisinde çözdürülen besiyeri 121ºC'de 15 dakika otoklavda steril edilmiş ve petri kaplarına dağıtılmıştır. Tek koloni ekimleri yapılan bakteriler 37ºC' de 24-48 saat inkübe edilmiş, pembe koloni oluşturanlar biyofilm negatif, koyu kırmızı-siyah koloni oluşturanlar biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.9. Kongo Red Agar'da biyofilm oluşumu (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.7.2. Mikroplak yöntemi

Enterococcus kolonileri, 5 ml Tryptic Soy Broth'da (MERCK 105459) süspanse edilmiş 37°C'de 18 saat inkübe edilerek 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Fosfat tamponlu çözelti (PBS) içinde, hücre topakları, yapışma özelliklerinden, negatif kontrol olarak steril TSB içeren 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakalarının oyukları ile tespit edilip yıkanmıştır. 37°C'de 24 saat inkübe edilen mikrotitre plakaları steril PBS ile yıkanarak 28-30°C'de kurutulmuştur. Kristal viyole ile boyanmış ve 30 dakika bekletilmiştir. Kuyucuklar,

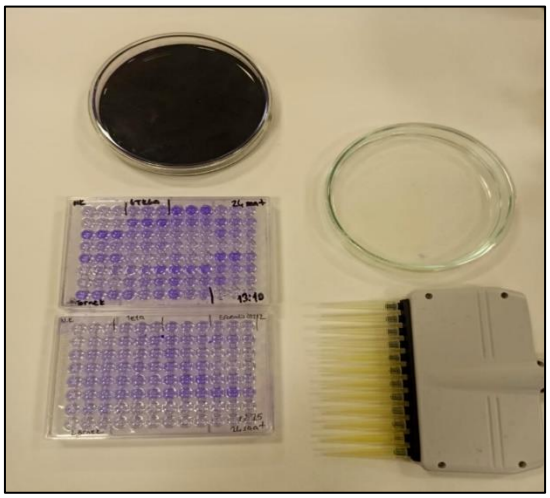
deiyonize su ile yıkanarak tekrar sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kristal viyole yapışık hücrelere bağlanarak 150 ml %99 etanol içinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Mikroplaka okuyucu ile ilgili kuyucuklarda 570 ve 595 nm'de OD okumaları yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* 29212 kullanılmıştır. Aşağıdaki tabloda belirtilen değerlere göre "+,++,+++" şeklinde değerlendirilmiştir (Stepanović ve ark., 2007).

Çizelge 3.2. Mikrotiter plaka yönteminde biyofilm oluşturmanın sınıflandırılması

Cut-off değeri	OD değerleri
hesaplama	sonuçlarının ortalaması
OD > 4 × ODc	OD > 0.236 (Güçlü)
2 × ODc < OD ≤ 4 × ODc	0.118 < OD ≤ 0.236 (ılıman)
ODc < OD ≤ 2 × ODc	0.059 < OD ≤ 0.118 (Zayıf)
OD ≤ 0.059	OD ≤ 0.059 (Hiçbiri)

Tryptic Soy Broth (MERCK 105459)

37 gr tartılarak 1000 ml distile suda çözdürülüp 10 ml cam tüplere aktarılmıştır. Otoklavda 121ºC'de 15 dakika steril edilir. 25ºC'da pH'sı 7,3±0,2'dir.



Resim 3.10. Mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumu (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

3.8. *Enterococcus* İzolatlarının Genomik DNA İzolasyonu

İzolatların genomik DNA izolasyonları yöntemine göre yapılmış ve DNA bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltılmış daha sonra agaroz jelde görüntülenmiştir.

Laboratuvarımızda ticari PCR kit ile izolatların genomik DNA izolasyonları yapılmış olup hemen kullanılmayacak olan DNA örneklerinde kirlilik ve kontaminasyon olmaması için çalışma yapılıncaya kadar -20ºC'de saklanmıştır. Thermo scientific GeneJET Genomic DNA Purification ticari kit protokolü DNA izolasyonu yapılacak *Enterococcus* izolatları için optimize edilmiştir.

DNA izolasyonu

1. *Enterococcus* izolatları cam tüplerdeki Serum Fizyolojik (SF) çözeltisine alınmış ve en az 1 McFarland ayarlanmıştır.
2. Cam tüplerdeki kültürden 1500 µl alınıp 2 ml'lik eppendorf tüpe aktarılarak, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
3. Süpernatant kısmı atılarak üzerine 180 µl kendi hazırladığımız lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, add lysozyme to 20 mg/mL) eklenip kuru blok ısıtıcıda 37ºC'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyon sonunda eppendorf tüplere kitin içinde bulunan 200 µl Lysis Solution ve 20 µl Proteinase K eklenip vortekslenmiştir. Kuru blok ısıtıcıda 56ºC'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyondan sonra kitin içinde bulunan 20 µl RNase A Solution eklenip iyice vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üzerine 400 µl %50'lik etanol eklenip vortekslenmiştir.
6. 2 ml'lik eppendorf tüplerdeki örnekler 1.5 ml'lik filtreli tüplere aktarılmış ve 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
7. Santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atılmış ve filtre yeni bir tüpe yerleştirilmiştir.
8. 500 µl Wash Buffer I (etanol ilaveli) eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
9. Toplama tüpündeki sıvı atılıp, 500 µl Wash Buffer II eklenerek 3 dk 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

10. Altındaki süpernatant atılarak filtreler yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir.
11. 25 µl Elution Buffer filtrelere eklenip 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
12. Toplanan DNA'nın miktarı Biotek Epoch Take3 Plate ile ölçülmüştür.
13. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR/PCR) yapılmayacak ise DNA'lar -20^{o}C de saklanmıştır. PZR çalışmasına başlanacağı zaman karışım hazır olana kadar +4^{o}C de saklanmıştır.

3.9. *Enterococcus*'ların Virülans Genlerinin Tespiti için PZR

1 örnek için PZR karışımı (mix) hazırlanırken forward primer (1:10 Sulandırılmış/10µM) 1 µl ve

reverse primerden (1:10 Sulandırılmış/10µM) 1 µl kullanılmıştır. Mix olarak GeneMark PCR Hot-Start Master Mix II (5x) kullanılmıştır. 4DNA miktarı x µl ve su miktarı 14-x µl, toplam mix 10 µl olacak şekilde ayarlanmıştır.

Reaksiyon;

efaA (hücre duvarı yapışkanlığı) için (499 bp):

94^{o}C'de 5 dakika
94^{o}C'de 1 dakika
46^{o}C'de 1 dakika
72^{o}C'de 1 dakika
} 30x
72^{o}C'de 8 dakika
Cooling: +4^{o}C de Sonsuz

Reaksiyon;

esp (enterokok yüzey proteini) için (504 bp):

94ºC'de 2 dakika
94ºC'de 1 dakika
58ºC'de 1 dakika
72ºC'de 1 dakika
72ºC'de 7 dakika
30x
Cooling: +4ºC de Sonsuz

Reaksiyon;

gelE (jelatinaz) için (402 bp):

94ºC'de 2 dakika
94ºC'de 1 dakika
56ºC'de 1 dakika
72ºC'de 1 dakika
30x
72ºC'de 5 dakika
Cooling: +4ºC de Sonsuz

Reaksiyon;

ccf (cinsiyet feromonu) için (543 bp):

94ºC'de 2 dakika
56ºC'de 2 dakika
72ºC'de 2 dakika
92ºC'de 15 saniye
56ºC'de 15 saniye
72ºC'de 15 saniye
30x
72ºC'de 4 dakika
Cooling: +4ºC de Sonsuz

Reaksiyon;

cpd (cinsiyet feromonu) için (782 bp):

94ºC'de 2 dakika

56ºC'de 2 dakika

72ºC'de 2 dakika

92ºC'de 15 saniye

56ºC'de 15 saniye

72ºC'de 15 saniye

72ºC'de 4 dakika

30x

Cooling: +4ºC de Sonsuz

Reaksiyon;

hyl (hiyalüronidaz) için (276 bp):

95ºC'de 5 dakika

94ºC'de 1 dakika

56ºC'de 1 dakika

72ºC'de 1 dakika

72ºC'de 8 dakika

30x

Cooling: +4ºC de Sonsuz

1 µl DNA boyası ile karıştırılan 4 µl Ladder ve 5 µl PZR örneği, mikropipet kullanılarak pipetaj yöntemiyle karıştırılıp jele yüklenerek 30-45 dakika aralıklarında 80V'da yürütülmüştür. Uygun bölgede ve istenilen büyüklükte bant gözlendiğinde jel görüntüleme sistemi ile görüntüler kaydedilmiştir. Çalışılan her gen için pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* 29212 kullanılarak yürütülmüştür.

Çizelge 3.3. Literatürden alınan primerler

Primer Adı	Baz Dizisi
efaA (Mannu et al., 2003)	F: CGTGAGAAAGAAATGGAGGA
	R: CTACTAACACGTCACGAATG
gelE (Mannu et al., 2003)	F: AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC
	R: CTTCATTATTTACACGTTTG
esp (Shankar et al., 1999)	F: TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC
	R: CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG
cpd (Eaton and Gasson, 2001)	F:TGGTGGGTTATTTTTCAATTC
	R:TACGGCTCTGGCTTACTA
ccf (Eaton and Gasson, 2001)	F:GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG
	R:AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT
hyl (Vankerckhoven et al., 2004)	F:ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG
	R:GACTGACGTCCAAGTTTCCAA

F: Forward, R: Reverse



Resim 3.11. Primer genlerin görüntüleme cihazı ile görüntülenmesi (Fotoğraf, G.Ü. Fen Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Tuğçe Gürkan tarafından çekilmiştir)

4. BULGULAR

Çalışmamızda Eylül–Aralık 2020 tarihlerinde, Ankara'da bulunan çeşitli pazar, market, çiftlik ve sokak satıcılarında satışa sunulan çiğ süt, peynir, çiğ tavuk (göğüs, but, kanat), çiğ et (gerdan, antrikot, sternum, sırt) örneklerinin her birinden 20 adet olmak üzere toplam 80 gıda örneği materyal olarak kullanılmıştır. Bergey's of Manual Systematic Bacteriology ve Manual of Clinical Microbiology'de belirtilen çeşitli biyokimyasal testlerle tanımlanmış olan 60 *Enterococcus* türünün tanımlamaları Becton Dickinson (BD) BBL Crystal Identification Systems ve Enteric/Nonfermenter ID Kit ile ve MALDI-TOF MS (Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu) doğrulanmıştır.

Çizelge 4.1. Gıda örneklerinin örnek sayısına göre dağılımı

Materyal	Çalışılan örnek sayısı
Çiğ Süt	20
Peynir	20
Tavuk	20
Et	20
TOPLAM	80

Çizelge 4.1.'de belirtilen araştırma materyali olarak çiğ süt, peynir, tavuk ve et örneklerinin her birinden 20 adet olmak üzere toplam 80 gıda örneği çalışılmıştır.

Çizelge 4.2. MALDI TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan *Enterococcus* türlerinin tür tayini

No	İzolat no	Tür Tayini
1	A1	*Enterococcus faecium*
2	A2	*Enterococcus faecalis*
3	A3	*Enterococcus faecium*
4	A4	*Enterococcus faecium*
5	A5	*Enterococcus faecalis*
6	A6	*Enterococcus faecalis*
7	A7	*Enterococcus faecalis*
8	A8	*Enterococcus faecalis*
9	A9	*Enterococcus faecalis*
10	A10	*Enterococcus faecalis*
11	A11	*Enterococcus faecalis*
12	A12	*Enterococcus faecium*
13	B1	*Enterococcus faecalis*
14	B2	*Enterococcus faecalis*
15	B3	*Enterococcus faecalis*
16	B4	*Enterococcus faecalis*
17	B5	*Enterococcus faecalis*
18	B6	*Enterococcus faecalis*
19	B7	*Enterococcus faecalis*
20	B8	*Enterococcus faecalis*
21	B9	*Enterococcus faecalis*
22	B10	*Enterococcus faecalis*
23	B11	*Enterococcus faecalis*
24	B12	*Enterococcus faecalis*
25	C1	*Enterococcus faecalis*
26	C2	*Enterococcus faecium*
27	C3	*Enterococcus faecalis*
28	C4	*Enterococcus faecalis*
29	C5	*Enterococcus faecalis*
30	C6	*Enterococcus faecium*
31	C7	*Enterococcus faecium*
32	C8	*Enterococcus faecium*
33	C9	*Enterococcus faecium*
34	C10	*Enterococcus faecalis*
35	C11	*Enterococcus faecium*
36	C12	*Enterococcus faecium*
37	D1	*Enterococcus faecalis*
38	D2	*Enterococcus faecalis*
39	D3	*Enterococcus faecalis*
40	D4	*Enterococcus faecalis*
41	D5	*Enterococcus faecium*
42	D6	*Enterococcus faecalis*
43	D7	*Enterococcus faecalis*
44	D8	*Enterococcus faecium*
45	D9	*Enterococcus faecium*
46	D10	*Enterococcus faecalis*
47	D11	*Enterococcus faecium*
48	D12	*Enterococcus faecalis*
49	E1	*Enterococcus faecalis*
50	E2	*Enterococcus faecalis*
51	E3	*Enterococcus faecalis*
52	E4	*Enterococcus faecalis*
53	E5	*Enterococcus faecalis*
54	E6	*Enterococcus faecium*
55	E7	*Enterococcus faecalis*
56	E8	*Enterococcus faecium*
57	E9	*Enterococcus faecalis*
58	E10	*Enterococcus faecium*
59	E11	*Enterococcus faecalis*
60	E12	*Enterococcus faecalis*

Çizelge 4.2.'e göre çeşitli çiğ gıdalardan izole ettiğimiz 60 *Enterococcus* türünün 42 tanesi *Enterococcus faecalis*, 18 tanesi *Enterococcus faecium* olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus*'ların izole edildikleri materyallere göre dağılımları

Gıda örnek adı	*Enterococcus faecalis*		*Enterococcus faecium*		Toplam	
	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%
Çiğ Süt	11	26,1	5	27,7	16	26,6
Peynir	12	28,5	9	50	21	35
Çiğ Tavuk	10	23,8	1	5,5	11	18,3
Et	9	21,4	3	16,6	12	20
TOPLAM	42	100	18	100	60	100

Çizelge 4.3'e göre; çalışılan gıda örneklerinden izole edilen 60 *Enterococcus* izolatının 16'sı (%26,6) çiğ süt, 21'i (%35) peynir, 11'i (%18,3) çiğ tavuk, 12'si (%20) et örneğinden elde edilmiştir. Yapılan MALDI TOF MS bakteri tür tanımlama testine göre 60 *Enterococcus* izolatının 42'si (%70) *E.faecium*, 18'i (%30) *E.faecium* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.4. Çiğ tavuk örneklerinden izole edilen 11 *Enterococcus* spp. izolatlarının numune türlerine göre dağılımı

Çiğ tavuk	Göğüs		But		Kanat		Boyun	
	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%
Enterococcus spp	2	18,1	4	36,3	4	36,3	1	9

Çizelge 4.4'e göre; Çiğ tavuk örneklerinden 11 *Enterococcus* spp. izolatının 2'si (%18,1) göğüs, 4'ü (%36,3) but, 4'ü (%36,3) kanat ve 1'i (%9) boyundan elde edilmiştir. Çiğ tavukta *Enterococcus* izolatları en fazla 4 (%36,3) örnek ile but ve kanatta tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5. Et örneklerinden izole edilen 12 *Enterococcus* spp. izolatının numune türlerine göre dağılımı

Et	Gerdan		Antrikot		Sternum		Sırt	
	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%
Enterococcus spp	2	16,6	4	33,3	4	33,3	2	16,6

Çizelge 4.5'e göre; Et örneklerinden 12 *Enterococcus* spp. izolatının 2'si (%16,6) gerdan ve sırt, 4'ü (%33,3) antrikot ve sternumdan elde edilmiştir. En fazla izolat elde edilen gıda örnekleri 4 (%33,3) örnek ile antrikot ve sternum olmuştur.

Çizelge 4.6. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençliliği

Antibiyotik Adı	Duyarlı		Dirençli	
	İzolat sayısı	%	İzolat sayısı	%
Ampisilin (AM)	58	96,6	2	3,3
Eritromisin (E)	32	53,3	28	46,6
Tetrasiklin (TE)	11	18,3	49	81,6
Kloramfenikol (C)	60	100	-	0
Siprofloksasin (CIP)	59	98,3	1	1,6
Streptomisin (S)	60	100	-	0
Gentamisin (CN)	57	95	3	5
Vankomisin (VA)	60	100	-	0
Norfloksasin (NOR)	58	96,6	2	3,3
Teikoplanin (TEC)	60	100	-	0
Kanamisin (K)	26	43,3	34	56,6
Amoksisilin Klavulonik Asit (AMC)	42	70	18	30

Çizelge 4.6'ya göre; Gıda örneklerinden izole edilen 60 *Enterococcus* spp. izolatının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik ve duyarlılık oranlarında bütün izolatların kloramfenikol, streptomisin, vankomisin ve teikoplanine %100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek dirençlilik %81,6 ile tetrasiklin olarak gözlenmiştir. En düşük dirençlilik ise %1,6 ile siprofiloksasin olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarının antibiyotiklere göre sayısı ve oranları

	Enterococcus faecalis	
Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Dirençli(%)
Ampisilin (AM)	40 (%95,2)	2 (%4,7)
Eritromisin (E)	22 (%52,3)	20 (%47,6)
Tetrasiklin (TE)	4 (%9,5)	38 (%90,4)
Kloramfenikol (C)	42 (%100)	-
Siprofloksasin (CIP)	42 (%100)	-
Streptomisin (S)	42 (%100)	-
Gentamisin (CN)	42 (%100)	-
Vankomisin (VA)	42 (%100)	-
Norfloksasin (NOR)	42 (%100)	-
Teikoplanin (TEC)	42 (%100)	-
Kanamisin (K)	14 (%33,3)	28 (%66,6)
Amoksisilin Klavulonik Asit (AMC)	42 (%100)	-

Çizelge 4.7'ye göre; Gıda örneklerinden izole edilen 42 *E.faecium* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarında bütün izolatların kloramfenikol, streptomisin, vankomisin, norfloksasin, ampisilin, siprofloksasin, gentamisin, teikoplanin ve amoksisilin klavulonik asite % 100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

E.faecium türlerinin en fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik ise %90,4 ile tetrasiklindir.

Çizelge 4.8. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecium* izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarının antibiyotiklere göre sayısı ve oranları

	Enterococcus faecium	
Antibiyotikler	Duyarlı (%)	Dirençli (%)
Ampisilin (AM)	18 (%100)	-
Eritromisin (E)	10 (%55,5)	8 (%44,4)
Tetrasiklin (TE)	7 (%38,8)	11 (%61,1)
Kloramfenikol (C)	18 (%100)	-
Siprofloksasin (CIP)	17 (%94,4)	1 (%5,5)
Streptomisin (S)	18 (%100)	-
Gentamisin (CN)	18 (%100)	-
Antibiyotikler	Duyarlı	Dirençli
Vankomisin (VA)	18 (%100)	-
Norfloksasin (NOR)	16 (%88,8)	2 (%11,1)
Teikoplanin (TEC)	18 (%100)	-
Kanamisin (K)	12 (%66,6)	6 (%33,3)
Amoksisilin Klavulonik Asit (AMC)	18 (%100)	0

Çizelge 4.8‘e göre; Gıda örneklerinden izole edilen 18 *E.faecium* izolatının disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençlilik oranlarında bütün izolatların ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, vankomisin, teikoplanin ve amoksisilin klavulonik asite % 100 duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *Efaecium* türlerinin %94,4 ile siprofloksasin, %88,8 ile norfloksasin, %66,6 ile kanamisine duyarlı olarak tespit edilmiştir. En fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik ise %61,1 ile tetrasiklindir.

Araştırmamızda izole edilen 60 *Enterococcus* izolatının virülans karakterlerinden; hemolitik aktivitesi, yüzey tabakası varlığı, biyofilm oluşumu ve virülans genlerine bakılmıştır.

Çizelge 4.9. Gıda örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarının hemolitik aktivite sonuçları

No	İzolat no	Hemolitik Aktivite	
		Pozitif	Negatif
1	*Enterococcus faecium* (A1)		+
2	*Enterococcus faecalis* (A2)		+
3	*Enterococcus faecium* (A3)		+
4	*Enterococcus faecium* (A4)		+
5	*Enterococcus faecalis* (A5)		+
6	*Enterococcus faecalis* (A6)		+
7	*Enterococcus faecalis* (A7)		+
8	*Enterococcus faecalis* (A8)		+
9	*Enterococcus faecalis* (A9)	+	
10	*Enterococcus faecalis* (A10)	+	
11	*Enterococcus faecalis* (A11)	+	
12	*Enterococcus faecium* (A12)		+
13	*Enterococcus faecalis* (B1)		+
14	*Enterococcus faecalis* (B2)		+
15	*Enterococcus faecalis* (B3)	+	
16	*Enterococcus faecalis* (B4)		+
17	*Enterococcus faecalis* (B5)	+	
18	*Enterococcus faecalis* (B6)	+	
19	*Enterococcus faecalis* (B7)		+
20	*Enterococcus faecalis* (B8)		+
21	*Enterococcus faecalis* (B9)		+
22	*Enterococcus faecalis* (B10)		+
23	*Enterococcus faecalis* (B11)		+
24	*Enterococcus faecalis* (B12)		+
25	*Enterococcus faecalis* (C1)		+
26	*Enterococcus faecium* (C2)		+
27	*Enterococcus faecalis* (C3)	+	
28	*Enterococcus faecalis* (C4)		+
29	*Enterococcus faecalis* (C5)		+
30	*Enterococcus faecium* (C6)		+
31	*Enterococcus faecium* (C7)	+	
32	*Enterococcus faecium* (C8)	+	
33	*Enterococcus faecium* (C9)	+	
34	*Enterococcus faecalis* (C10)		+
35	*Enterococcus faecium* (C11)		+
36	*Enterococcus faecium* (C12)		+
37	*Enterococcus faecalis* (D1)	+	
38	*Enterococcus faecalis* (D2)		+
39	*Enterococcus faecalis* (D3)		+
40	*Enterococcus faecalis* (D4)		+
41	*Enterococcus faecium* (D5)		+
42	*Enterococcus faecalis* (D6)		+
43	*Enterococcus faecalis* (D7)		+
44	*Enterococcus faecium* (D8)		+
45	*Enterococcus faecium* (D9)		+
46	*Enterococcus faecalis* (D10)		+
47	*Enterococcus faecium* (D11)		+
48	*Enterococcus faecalis* (D12)	+	
49	*Enterococcus faecalis* (E1)	+	
50	*Enterococcus faecalis* (E2)		+
51	*Enterococcus faecalis* (E3)	+	
52	*Enterococcus faecalis* (E4)		+
53	*Enterococcus faecalis* (E5)		+
54	*Enterococcus faecium* (E6)		+
55	*Enterococcus faecalis* (E7)		+
56	*Enterococcus faecium* (E8)		+
57	*Enterococcus faecalis* (E9)	+	
58	*Enterococcus faecium* (E10)		+
59	*Enterococcus faecalis* (E11)	+	
60	*Enterococcus faecalis* (E12)	+	

Çizelge 4.9'a göre çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 60 adet *Enterococcus* spp. türü bakterinin hemolitik aktivite açısından 17'si (%28,3) pozitif, 43'ü (%71,6) negatif sonuç vermiştir.

Çizelge 4.10. Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının hemolitik aktivite sonuçlarına göre sayısı ve yüzde oranları

Bakteri Türü	Hemolitik Aktivite	
	Pozitif (%)	Negatif (%)
Enterococcus faecalis	14 (%82,3)	28 (%65,1)
Enterococcus faecium	3 (%17,6)	15 (%34,8)
TOPLAM	17 (%28,3)	43 (%71,6)

Çizelge 4.10'a göre pozitif sonuç veren *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinden, 3'ü (%17,6) *E.faecium*, 14'ü (%82,3) *E.faecalis*'tir. Negatif sonuç veren bakteri türlerinden 15'i (%34,8) *E.faecium*, 28'i (%65,1) *E.faecalis*'tir.

Çizelge 4.11. Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının yüzey tabakası (S-layer) bulundurup bulundurmaması

No	İzolat no	Yüzey Tabakası (S-Layer) Varlığı TSA-C Renkleri		
		Açık Açık	Orta Orta	Koyu Koyu
1	*Enterococcus faecium* (A1)	+		
2	*Enterococcus faecalis* (A2)		+	
3	*Enterococcus faecium* (A3)	+		
4	*Enterococcus faecium* (A4)	+		
5	*Enterococcus faecalis* (A5)			+
6	*Enterococcus faecalis* (A6)			+
7	*Enterococcus faecalis* (A7)		+	
8	*Enterococcus faecalis* (A8)			+
9	*Enterococcus faecalis* (A9)			+
10	*Enterococcus faecalis* (A10)			+
11	*Enterococcus faecalis* (A11)			+
12	*Enterococcus faecium* (A12)		+	
13	*Enterococcus faecalis* (B1)	+		
14	*Enterococcus faecalis* (B2)	+		
15	*Enterococcus faecalis* (B3)			+
16	*Enterococcus faecalis* (B4)			+
17	*Enterococcus faecalis* (B5)		+	
18	*Enterococcus faecalis* (B6)			+
19	*Enterococcus faecalis* (B7)			+
20	*Enterococcus faecalis* (B8)		+	
21	*Enterococcus faecalis* (B9)		+	
22	*Enterococcus faecalis* (B10)		+	
23	*Enterococcus faecalis* (B11)		+	
24	*Enterococcus faecalis* (B12)		+	
25	*Enterococcus faecalis* (C1)		+	

Çizelge 4.11. (devam) Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının yüzey tabakası (S-layer) bulundurup bulundurmaması

No	İzolat no	Yüzey Tabakası (S-Layer) Varlığı TSA-C Renkleri		
		Açık Açık	Orta Orta	Koyu Koyu
26	*Enterococcus faecium* (C2)	+		
27	*Enterococcus faecalis* (C3)			+
28	*Enterococcus faecalis* (C4)		+	
29	*Enterococcus faecalis* (C5)		+	
30	*Enterococcus faecium* (C6)	+		
31	*Enterococcus faecium* (C7)		+	
32	*Enterococcus faecium* (C8)			+
33	*Enterococcus faecium* (C9)			+
34	*Enterococcus faecalis* (C10)		+	
35	*Enterococcus faecium* (C11)	+		
36	*Enterococcus faecium* (C12)	+		
37	*Enterococcus faecalis* (D1)		+	
38	*Enterococcus faecalis* (D2)		+	
39	*Enterococcus faecalis* (D3)		+	
40	*Enterococcus faecalis* (D4)		+	
41	*Enterococcus faecium* (D5)	+		
42	*Enterococcus faecalis* (D6)		+	
43	*Enterococcus faecalis* (D7)			+
44	*Enterococcus faecium* (D8)			+
45	*Enterococcus faecium* (D9)	+		
46	*Enterococcus faecalis* (D10)			+
47	*Enterococcus faecium* (D11)	+		
48	*Enterococcus faecalis* (D12)			+
49	*Enterococcus faecalis* (E1)			+
50	*Enterococcus faecalis* (E2)		+	
51	*Enterococcus faecalis* (E3)			+
52	*Enterococcus faecalis* (E4)			+
53	*Enterococcus faecalis* (E5)		+	
54	*Enterococcus faecium* (E6)			+
55	*Enterococcus faecalis* (E7)		+	
56	*Enterococcus faecium* (E8)	+		
57	*Enterococcus faecalis* (E9)			+
58	*Enterococcus faecium* (E10)	+		
59	*Enterococcus faecalis* (E11)			+
60	*Enterococcus faecalis* (E12)			+

Çizelge 4.11'e göre çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 60 adet *Enterococcus* spp. türü bakterinin yüzey tabakası varlığı tespit edilerek bakterilerin üreme renginin koyuluğu açısından değerlendirilmiştir. Bakterilerin 24'ü (%40) koyu, 22'si (%36,6) orta, 14'ü (%23,3) açık renkte üremiştir. Koyu renk üreyen bakteri türlerinden 4'ü (%16,6) *E.faecium*,

20’si (%83,3) *E.faecalis*’tir. Orta ve koyu renkte üreyen 46 (%76,6) *Enterococcus* izolatı s-layer pozitif, 14 (%23,3) izolat s-layer negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12. Gıda örneklerinden izole edilen 42 *Enterococcus faecalis* ve 18 *Enterococcus faecium* izolatının yüzey tabakası (S-layer) varlığına göre TSA-C renk koyulukları sonuçlarının sayısı ve yüzde oranları

Bakteri Türü	Yüzey Tabakası (S-Layer) Varlığı TSA-C Renkleri		
	Açık (%)	Orta (%)	Koyu (%)
Enterococcus faecalis (n=42)	2 (%14,2)	20 (%83,3)	20 (%83,3)
Enterococcus faecium (n=18)	12 (%85,7)	2 (%14,2)	4 (%16,6)
TOPLAM (n=60)	14 (%23,3)	22 (%36,6)	24 (%40)

n=izolat sayısı

Çizelge 4.12’ye göre Yüzey tabakası varlığını öğrenmek için kullandığımız TSA-C besiyerinde toplamda 60 *E. faecalis* ve *E.faecium* izolatımızın 14’ü (%23,3) açık, 22’si (%36,6) orta, 24’ü (%40) koyu renkte üremiştir. Açık renk üreyen toplam 14 adet bakterinin 12’si (%85,7) *E.faecium*, 2’si (%14,2) *E.faecalis*, orta renkte üreyen 22 adet bakterinin 2’si (%14,2) *E.faecium*, 20’si (%83,3) *E.faecalis*, koyu renkte üreyen 24 bakterinin 4’ü (%16,6) *E.faecium*, 20’si (%83,3) *E.faecalis*’tir. Orta ve koyu renkte üreyen toplam *E.faecalis* sayısı 40 olarak görülmüştür. *E.faecium* türlerinde daha çok açık renkte üreme görülmüştür.

Çizelge 4.13. Gıda örneklerinden izole edilen toplam 60 *Enterococcus* spp. türü bakterinin Kongo Red Agar’daki biyofilm aktivite ölçüm sonuçları

No	İzolat no	Biyofilm Aktivitesi
1	*Enterococcus faecium* (A1)	(+)
2	*Enterococcus faecalis* (A2)	(+)
3	*Enterococcus faecium* (A3)	(+++)
4	*Enterococcus faecium* (A4)	(++)
5	*Enterococcus faecalis* (A5)	(+)
6	*Enterococcus faecalis* (A6)	(+)
7	*Enterococcus faecalis* (A7)	(++)
8	*Enterococcus faecalis* (A8)	(++)
9	*Enterococcus faecalis* (A9)	(++)
10	*Enterococcus faecalis* (A10)	(++)
11	*Enterococcus faecalis* (A11)	(+)
12	*Enterococcus faecium* (A12)	(++)
13	*Enterococcus faecalis* (B1)	(+)
14	*Enterococcus faecalis* (B2)	(+)
15	*Enterococcus faecalis* (B3)	(+)
16	*Enterococcus faecalis* (B4)	(+)

Çizelge 4.13. (devam) Gıda örneklerinden izole edilen toplam 60 *Enterococcus* spp. türü bakterinin Kongo Red Agar'daki biyofilm aktivite ölçüm sonuçları

No	İzolat no	Biyofilm Aktivitesi
17	*Enterococcus faecalis* (B5)	(+)
18	*Enterococcus faecalis* (B6)	(+)
19	*Enterococcus faecalis* (B7)	(++)
20	*Enterococcus faecalis* (B8)	(+)
21	*Enterococcus faecalis* (B9)	(+)
22	*Enterococcus faecalis* (B10)	(++)
23	*Enterococcus faecalis* (B11)	(++)
24	*Enterococcus faecalis* (B12)	(++)
25	*Enterococcus faecalis* (C1)	(+)
26	*Enterococcus faecium* (C2)	(+)
27	*Enterococcus faecalis* (C3)	(++)
28	*Enterococcus faecalis* (C4)	(+)
29	*Enterococcus faecalis* (C5)	(+)
30	*Enterococcus faecium* (C6)	(++)
31	*Enterococcus faecium* (C7)	(+)
32	*Enterococcus faecium* (C8)	(++)
33	*Enterococcus faecium* (C9)	(+)
34	*Enterococcus faecalis* (C10)	(+)
35	*Enterococcus faecium* (C11)	(++)
36	*Enterococcus faecium* (C12)	(++)
37	*Enterococcus faecalis* (D1)	(++)
38	*Enterococcus faecalis* (D2)	(++)
39	*Enterococcus faecalis* (D3)	(+)
40	*Enterococcus faecalis* (D4)	(+)
41	*Enterococcus faecium* (D5)	(+++)
42	*Enterococcus faecalis* (D6)	(+)
43	*Enterococcus faecalis* (D7)	(+)
44	*Enterococcus faecium* (D8)	(+)
45	*Enterococcus faecium* (D9)	(++)
46	*Enterococcus faecalis* (D10)	(+)
47	*Enterococcus faecium* (D11)	(++)
48	*Enterococcus faecalis* (D12)	(+)
49	*Enterococcus faecalis* (E1)	(+)
50	*Enterococcus faecalis* (E2)	(+)
51	*Enterococcus faecalis* (E3)	(+)
52	*Enterococcus faecalis* (E4)	(+)
53	*Enterococcus faecalis* (E5)	(+)
54	*Enterococcus faecium* (E6)	(+)
55	*Enterococcus faecalis* (E7)	(+)
56	*Enterococcus faecium* (E8)	(++)
57	*Enterococcus faecalis* (E9)	(+)
58	*Enterococcus faecium* (E10)	(++)
59	*Enterococcus faecalis* (E11)	(+)
60	*Enterococcus faecalis* (E12)	(+)

(+): zayıf, (++):orta, (+++):kuvvetli.

Çizelge 4.13'e göre çeşitli gıda örneklerinden izole edilen 60 adet *Enterococcus* spp. türü bakterinin 36'sı (%60) zayıf, 22'si (%36,6) orta kuvvetli, 2'si (%3,3) kuvvetli biyofilm pozitif bulunmuştur. Kuvvetli biyofilm oluşumu 2 adet *E.faecium* örneğinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. 37°C'de 24 saat inkübasyonun kullanıldığı yönteme göre izolatların OD değerleri

Örnek Numarası	Bakteri Kodu	Cins/Tür	Numune Türü	OD (595) Ortalaması	OD ortalama-Kontrol Ortalama$_{(595)}$	Ortalama/NK Ortalaması
1	C10	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,214 (++)	0,075	2,85
2	D8	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,349 (+++)	0,21	1,66
3	D7	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,21 (++)	0,071	2,95
4	D5	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,191 (++)	0,052	3,67
5	E11	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,387 (+++)	0,248	1,56
6	D12	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/ Kanat	0,396 (+++)	0,176	2,25
7	E3	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	0,995 (+++)	0.775	1,28
8	E4	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	0,312 (+++)	0,092	3,39
9	D3	*Enterococcus faecalis*	Et/Antrikot	0,174 (++)	0,046	3,78
10	D4	*Enterococcus faecalis*	Et/Antrikot	0,889 (+++)	0,669	1,32
11	E1	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,41 (+++)	0,19	2,15
12	A1	*Enterococcus faecium*	Süt	0,419 (+++)	0,199	2,10
13	B3	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,827 (+++)	0,607	1,36
14	B11	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,358 (+++)	0,138	2,59
15	A12	*Enterococcus faecium*	Süt	0,238 (+++)	0,18	1,32
16	B10	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,365 (+++)	0,145	2,51
17	A11	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,281 (+++)	0,61	0,46
18	C12	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,332 (+++)	0,112	2,96
19	D9	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,208 (++)	0,012	17,3
20	D6	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,176 (++)	0,044	4
21	C6	*Enterococcus faecium*	Et/Sternum	0,513 (+++)	0,293	1,75
22	C2	*Enterococcus faecium*	Et/Sternum	0,173 (++)	0,047	3,68
23	B12	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Göğüs	0,256 (+++)	0,36	0,71
24	D2	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,589 (+++)	0,369	1,59
25	D1	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,255 (+++)	0,35	0,72
26	D11	*Enterococcus faecium*	Tavuk/Göğüs	0,475 (+++)	0,255	1,86
27	A6	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,621 (+++)	0,401	1,54
28	C4	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,397 (++)	0,177	2,24
29	B4	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,189 (++)	0,031	6,09
30	C5	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,384 (+++)	0,164	2,34
31	C3	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Boyun	0,473 (+++)	0,253	1,86
32	A4	*Enterococcus faecium*	Et/Döş	0,369 (+++)	0,149	2,47
33	B1	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,473 (+++)	0,253	1,39
34	B5	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,537 (+++)	0,317	1,69
35	B2	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,473 (+++)	0,253	1,39
36	B8	*Enterococcus faecalis*	Et/Gerdan	0,287 (+++)	0,101	2,84
37	E2	*Enterococcus faecalis*	Et/Gerdan	0,317 (+++)	0,131	2,41
38	Pozitif Kontrol	*Enterococcus faecalis* 29212	-	0,28 (+++)	0,094	2,97
39	C11	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,189 (++)	0,003	63
40	C9	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,319 (+++)	0,133	2,39
41	C1	*Enterococcus faecalis*	Et/Sternum	0,341 (+++)	0,155	2,2
42	E12	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	0,33 (+++)	0,144	2,29
43	A5	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	0,274 (+++)	0,088	3,11
44	D10	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,266 (+++)	0,08	3,32

Çizelge 4.14. (devam) 37ºC'de 24 saat inkübasyonun kullanıldığı yönteme göre izolatların OD değerleri

Örnek Numarası	Bakteri Kodu	Cins/Tür	Numune Türü	OD (595) Ortalaması	OD ortalama-Kontrol Ortalama$_{(595)}$	Ortalama/NK Ortalaması
45	E6	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,315 (+++)	0,129	2,44
46	E10	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,194 (++)	0,008	24,25
47	E8	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,263 (++)	0,018	9,36
48	E9	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,268 (+++)	0,082	3,26
49	C10	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,304 (+++)	0,118	2,57
50	C8	*Enterococcus faecium*	Süt	0,344 (+++)	0,158	2,17
51	A3	*Enterococcus faecium*	Süt	0,168 (++)	0,018	9,33
53	C7	*Enterococcus faecium*	Süt	0,302 (+++)	0,116	2,60
54	A2	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,300 (+++)	0,114	2,63
55	B7	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,471 (+++)	0,285	1,65
56	B6	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,261 (+++)	0,075	3,48
57	A10	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,298 (+++)	0,112	2,66
58	A9	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,364 (+++)	0,178	2,04
59	A8	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,396 (+++)	0,21	1,88
60	A7	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,472 (+++)	0,286	1,65
61	B9	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,294 (+++)	0,108	2,72

+:zayıf biyofilm, ++:ılıman biyofilm, +++:kuvvetli biyofilm

Çizelge 4.14'e göre 37ºC'de 24 saat inkübasyona bırakılan 60 izolat arasında en yüksek biyofilm değerine sahip olanı 7 numaralı et/sırt örneğinden izole edilen *E.faecium* türüne olup biyofilm değeri 595 nm'de 0,775'dir. Biyofilm değeri en düşük olan izolat ise 39 numaralı peynir örneğinden elde edilen *E.faecium* türüne ait olup biyofilm değeri 595 nm'de 0,003'tür. 12 (%19,6) izolat ılıman biyofilm (++) oluştururken, pozitif kontrol dahil 49 (%80,3) izolat kuvvetli biyofilm (+++) oluşturmuştur.

Çizelge 4.15. 37ºC'de 48 saat inkübasyonun kullanıldığı yönteme göre izolatların OD değerleri

Örnek numarası	Bakteri Kodu	Cins/Tür	Numune Türü	OD (595) ortalaması	OD ortalama-Kontrol Ortalama$_{(595)}$	Ortalama/ NK Ortalaması
1	C10	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,189 (++)	0,022	8,59
2	D8	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,286 (+++)	0,075	3,81
3	D7	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,288 (+++)	0,077	3,74
4	D5	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,162 (++)	0,049	3,30
5	E11	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,365 (+++)	0,154	2,37
6	D12	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,76 (+++)	0,428	1,77
7	E3	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	1,931 (+++)	1,599	1,20
8	E4	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	1,818 (+++)	1,486	1,22
9	D3	*Enterococcus faecalis*	Et/Antrikot	0,386 (+++)	0,054	7,14
10	D4	*Enterococcus faecalis*	Et/Antrikot	0,7 (+++)	0,368	1,90
11	E1	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,471 (+++)	0,139	3,38
12	A1	*Enterococcus faecium*	Süt	0,777 (+++)	0,445	1,74
13	B3	*Enterococcus faecalis*	Süt	2,449 (+++)	2,117	1,15
14	B11	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,913 (+++)	0,581	1,57
15	A12	*Enterococcus faecium*	Süt	0,251 (+++)	0,081	3,09
16	B10	*Enterococcus faecalis*	Süt	1,056 (+++)	0,724	1,45
17	A11	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,958 (+++)	0,626	1,53
18	C12	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,742 (+++)	0,41	1,80
19	D9	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,288 (+++)	0,044	6,54
20	D6	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,348 (+++)	0,016	21,75
21	C6	*Enterococcus faecium*	Et/Sternum	0,829 (+++)	0,497	1,66
22	C2	*Enterococcus faecium*	Et/Sternum	0,471 (+++)	0,139	3,38
23	B12	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Göğüs	0,436 (+++)	0,104	4,19
24	D2	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,830 (+++)	0,498	1,66
25	D1	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	1,662 (+++)	1,33	1,24
26	D11	*Enterococcus faecium*	Tavuk/Göğüs	0,975 (+++)	0,643	1,51
27	A6	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,647 (+++)	0,315	2,05
28	C4	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,866 (+++)	0,534	1,62
29	B4	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Kanat	0,531 (+++)	0,199	2,66
30	C5	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/But	0,913 (+++)	0,581	1,57
31	C3	*Enterococcus faecalis*	Tavuk/Boyun	0,722 (+++)	0,39	1,85
32	A4	*Enterococcus faecium*	Et/Sternum	0,705 (+++)	0,373	1,89
33	B5	*Enterococcus faecalis*	Süt	2,543 (+++)	2,211	1,15
34	B1	*Enterococcus faecalis*	Süt	1,004 (+++)	0,672	1,49
35	B2	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,972 (+++)	0,64	1,51
36	B8	*Enterococcus faecalis*	Et/Gerdan	0,742 (+++)	0,295	2,51
37	E2	*Enterococcus faecalis*	Et/Gerdan	0,791 (+++)	0,344	2,29
38	Pozitif Kontrol	*Enterococcus faecalis* 29212	-	0,927 (+++)	0,48	1,93
39	C11	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,410 (+++)	0,037	11,08
40	C9	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,617 (+++)	0,17	3,62
41	C1	*Enterococcus faecalis*	Et/Sternum	0,751 (+++)	0,304	2,47
42	E12	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	0,775 (+++)	0,328	2,36
43	A5	*Enterococcus faecalis*	Et/Sırt	0,698 (+++)	0,251	2,78
44	D10	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,835 (+++)	0,388	2,15
45	E6	*Enterococcus faecium*	Peynir	1,049 (+++)	0,602	1,74
46	E10	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,513 (+++)	0,066	7,77
47	E8	*Enterococcus faecium*	Peynir	0,842 (+++)	0,396	2,35
48	E9	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,773 (+++)	0,326	2,37
49	C10	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,481 (+++)	0,034	14,1
50	C8	*Enterococcus faecium*	Süt	0,723 (+++)	0,276	2,61
51	A3	*Enterococcus faecium*	Süt	0,496 (+++)	0,049	10,1
53	C7	*Enterococcus faecium*	Süt	0,702 (+++)	0,255	2,75
54	A2	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,540 (+++)	0,093	5,80
55	B7	*Enterococcus faecalis*	Peynir	1,168 (+++)	0,721	1,61
56	B6	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,787 (+++)	0,34	2,31
57	A10	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,693 (+++)	0,246	2,81
58	A9	*Enterococcus faecalis*	Peynir	0,526 (+++)	0,079	6,65
59	A8	*Enterococcus faecalis*	Peynir	1,778 (+++)	1,331	1,33
60	A7	*Enterococcus faecalis*	Peynir	1,125 (+++)	0,678	1,65
61	B9	*Enterococcus faecalis*	Süt	0,882 (+++)	0,435	2,02

Çizelge 4.15'e göre 37ºC'de 48 saat inkübe edilen 60 izolattan biyofilm değeri en yüksek olan süt örneğinden izole edilen 33 numaralı izolat olup *E.faecium* türüdür ve biyofilm değeri 595 nm'de 2,211'dir. Biyofilm değeri en düşük olan izolat ise yine süt örneğinden izole edilen 1 numaralı izolat olup *E.faecium* türüdür ve biyofilm değeri 595 nm'de 0,022'dir. 48 saatlik inkübe süresi sonunda biyofilm değeri yüksek olan izolatların genellikle *E.faecium* türü olduğu görülmüştür. 2 (%3,27) izolat ılıman biyofilm (++) oluştururken, pozitif kontrol dahil 59 (%96,7) izolat kuvvetli biyofilm (+++) oluşturmuştur.

Çizelge 4.16. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarının virülans özellikleri ve değerleri

Örnek Numarası	Bakteri Kodu	Cins/Tür	Mikroplate Biyofilm Değeri (48 saat)	Kongo Red Agar Biyofilm Değeri	Hemolitik Aktivite	S-Tabakası Varlığı Değeri
1	C10	*Enterococcus faecalis*	(++)	(+)	Negatif	Orta
2	D8	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
3	D7	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
4	D5	*Enterococcus faecium*	(++)	(+++)	Negatif	Açık
5	E11	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
6	D12	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
7	E3	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
8	E4	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
9	D3	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
10	D4	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
11	E1	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
12	A1	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+)	Negatif	Açık
13	B3	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
14	B11	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Orta
15	A12	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Orta
16	B10	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Orta
17	A11	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
18	C12	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negsitf	Açık
19	D9	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
20	D6	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
21	C6	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
22	C2	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+)	Negatif	Açık
23	B12	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Orta
24	D2	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Orta
25	D1	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Pozitif	Orta
26	D11	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
27	A6	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
28	C4	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
29	B4	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
30	C5	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
31	C3	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Pozitif	Koyu
32	A4	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
33	B5	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Orta
34	B1	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Açık
35	B2	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Açık
36	B8	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
37	E2	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
38	Pozitif Kontrol	*Enterococcus faecalis* 29212	(+++)	-	-	-
39	C11	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
40	C9	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
41	C1	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta

Çizelge 4.16. (devam) *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarının virülans özellikleri ve değerleri

Örnek Numarası	Bakteri Kodu	Cins/Tür	Mikroplate Biyofilm Değeri (48 saat)	Kongo Red Agar Biyofilm Değeri	Hemolitik Aktivite	S-Tabakası Varlığı Değeri
42	E12	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
43	A5	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
44	D10	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Koyu
45	E6	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
46	E10	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
47	E8	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Negatif	Açık
48	E9	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
49	C10	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
50	C8	*Enterococcus faecium*	(+++)	(++)	Pozitif	Koyu
51	A3	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+++)	Negatif	Açık
53	C7	*Enterococcus faecium*	(+++)	(+)	Pozitif	Orta
54	A2	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta
55	B7	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Koyu
56	B6	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Pozitif	Koyu
57	A10	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Pozitif	Koyu
58	A9	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Pozitif	Koyu
59	A8	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Koyu
60	A7	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(++)	Negatif	Orta
61	B9	*Enterococcus faecalis*	(+++)	(+)	Negatif	Orta

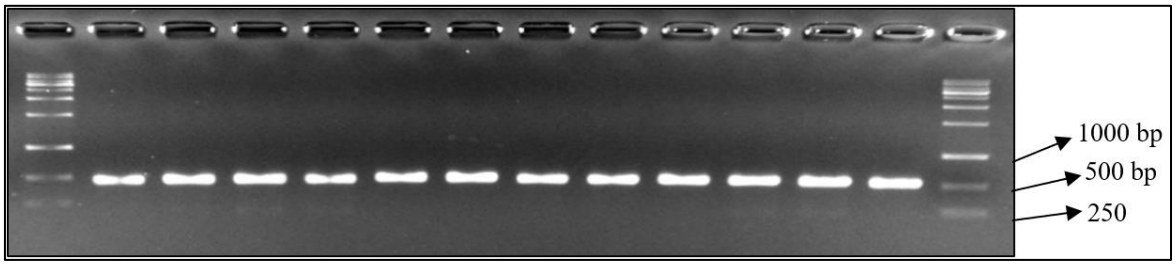
Çizelge 4.16.'ya göre *Enterococcus* türlerinde virülans özelliklerden, Kongo Red Agar ve Mikroplate yöntemiyle biyofilm oluşumu, hemolitik aktivite, S-tabakası varlığı incelenmiştir. 48 saatlik mikroplate yöntemi sonuçlarında *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinin 2'si orta biyofilm (++), pozitif kontrol dahil 59 izolatın kuvvetli biyofilm (+++) oluşturduğu gözlenmiştir. Kongo Red Agar yönteminde *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinin, mikroplate yöntemine göre kuvvetli biyofilm üretmediği tespit edilmiştir. Hemolitik aktivite 17 (%28,3) izolatta pozitif, 43 (%71,6) izolatta negatif gözlenmiştir. Koyu renk üreyen bakteri türlerinden 4'ü (%16,6) *E.faecium*, 20'si (%83,3) *E.faecalis*'tir. Orta ve koyu renkte üreyen 46 (%76,6) *Enterococcus* izolatı s-layer pozitif, 14 (%23,3) izolat s-layer negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.17. *Enterococcus* spp. izolatlarının primer genlerinin PZR ile tanımlamaları ve oranları

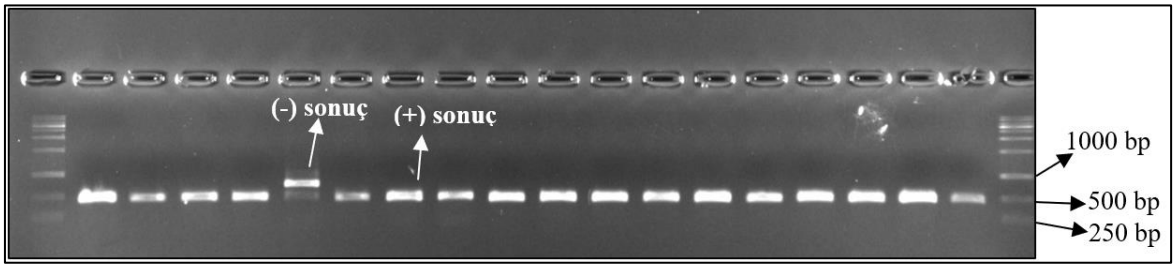
Virülans genler	60 *Enterococcus* spp. izolatında görülme oranı (%)
efaA (Hücre Duvarı Yapışkanlığı)	46 (%76,6)
esp (Enterokok Yüzey Proteini)	58 (%96,6)
gelE (Jelatinaz)	22 (%36,6)
ccf (Cinsiyet Feromonu)	38 (%63,3)
cpd (Cinsiyet Feromonu)	9 (%15)
hyl (Hiyalüronidaz)	11 (%18,3)

Çizelge 4.17'ye göre çalışmamızda *E.faecium* ve *E.faecium* türlerinde en yüksek oranda rastlanan virülans genler sırasıyla 58 (%96,6) esp, 46 (%76,6) efaA, 38 (%63,3) ccf olarak gözlenmiştir. En düşük oranda görülen virülans genler 9 (%15) ile cpd, 11 (%18,3) ile hyl olarak tespit edilmiştir.

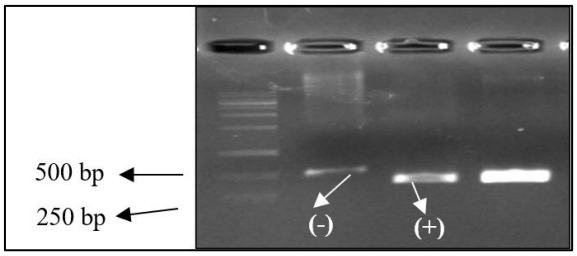
Enterococcus Türlerinin Virülans Genlerinin Jel Görüntüleri



Resim 4.1. *Enterococcus* türlerinde efaA geni (499 bp) agaroz jelde görüntüsü



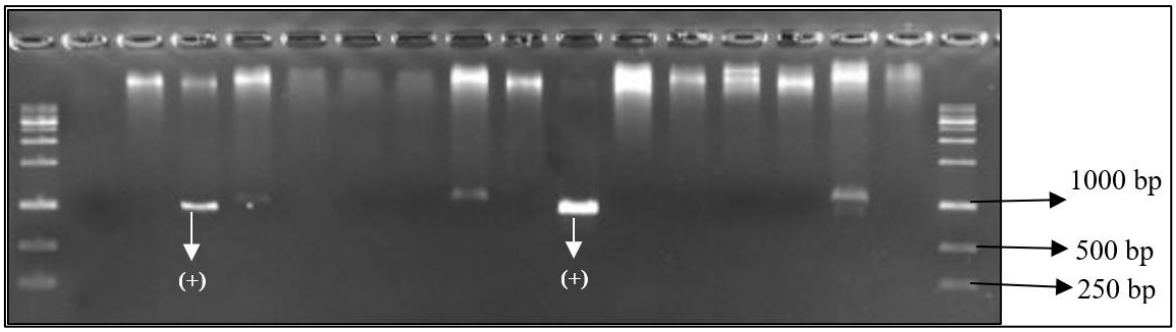
Resim 4.2. *Enterococcus* türlerinde esp geni (504 bp) agaroz jelde görüntüsü



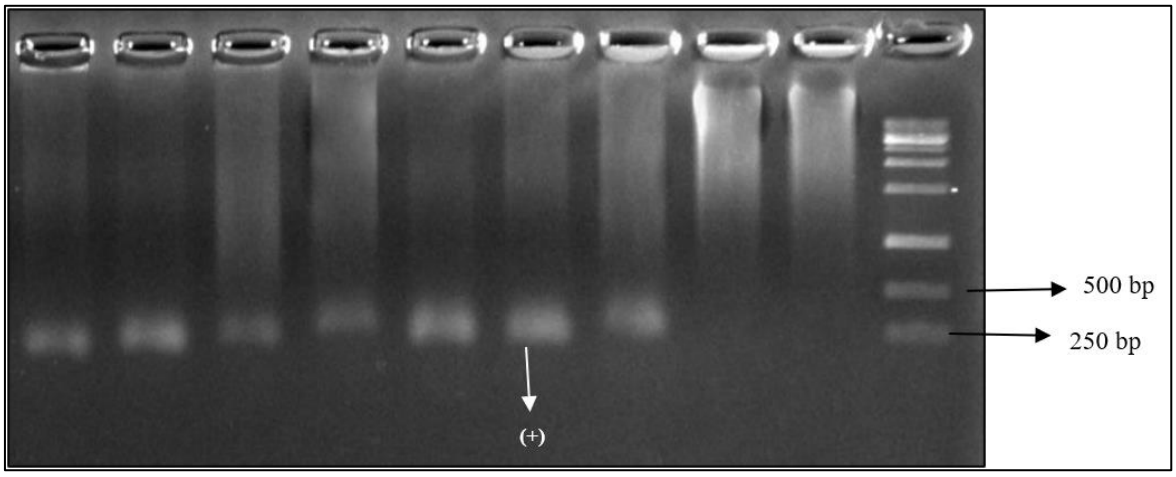
Resim 4.3. *Enterococcus* türlerinde gelE geni (402 bp) agaroz jelde görüntüsü



Resim 4.4. *Enterococcus* türlerinde ccf geni (543 bp) agaroz jelde görüntüsü



Resim 4.5. *Enterococcus* türlerinde cpd geni (782 bp) agaroz jelde görüntüsü



Resim 4.6. *Enterococcus* türlerinde hyl geni (276 bp) agaroz jelde görüntüsü

5. TARTIŞMA

Gıda sektörü günümüzde ve dünyada önem arz eden, uluslararası alanda da aktif çalışılan geniş bir sektördür. Tartışmalar, enterokokların gıdalar aracılığıyla bulaşıp bulaşmadığı yönünde ve bulaştığı zamanlarda patojenik etkisinin olup olmadığı yönünde yoğunlaşmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar *E.faecium* ve *E. Faecium* başta olmak üzere gıdalarda bulunan enterokokların klinik izolatlara göre daha düşük patojeniteye sahip olduğu düşünülmektedir.

Enterokoklar, hayvansal gıdalar başta ve önem arz eden değerde olmak üzere pek çok gıdada ve hayvanların bağırsak florasında yaygın bulunmalarından dolayı çalışmalarda *E.faecium* ve *E.faecium* türlerinin fekal kontaminasyon göstergesi olarak bildirildiği görülmektedir. Ancak bazı çalışmalar da gıdada *E. Faecalis*'in yaygın bulunuşunun ilk nedeninin fekal kontaminasyon göstergesi olarak değerlendirilmemesine, gıdalarda starter veya probiyotik kültür olarak kullanılmasına ve bunların gıda güvenliği açısından çok detaylı ve iyi değerlendirilmesi gerektiğine değinmektedir. Fekal kontaminasyon sonucu enfeksiyon riski taşıdıkları için *Enterococcus* türlerinin gıda zincirine girecek suşlarının seçilmesinde daha dikkatli olmak gerekmektedir (Karataş, 2005).

Hayvansal ürünlerin (peynir ve et gibi) veya fermente edilen ürünlerin fermantasyonu ve olgunlaşmasında faydalı olabilecekleri gibi gıdalarda kontamine nedeni de olabilirler. Enterokokların pastörizasyondan kurtulabilmeleri, yüksek NaCl konsantrasyonlarında ve geniş pH aralıklarında büyüyebilmeleri yemeye hazır gıdaların kalıntı mikrobiyotasını oluşturabilirler (De Vuyst ve ark.,, 2006; Ben Braïek & Smaoui, 2019).

Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları, tüm dünyada büyük ekonomik zararlara neden olan ve önemli halk sağlığı sorunlarına yol açan, bu durumlardan et ve et ürünleri başta olmak üzere hayvansal gıdaların bu sorunlara yol açmada büyük önem taşıdığı ve bazı patojenlerin de bu olumsuz olaylarda sorumlu tutulduğu, dikkat edilmesi gereken hususlardır. Özellikle çekme ve karıştırma işlemleri sırasında kıymanın ve etin yüzey mikroflorasını oluşturan mikroorganizmalar bu gıdaların her bölgesine yayılmakta ve uygun koşullar altında çoğalıp ürünün dayanıklılık süresini aza indirgemekte ve halk sağlığı açısından göz ardı edilemeyecek potansiyel bir risk taşımaktadır (Togay ve Karayiğit, 2022).

Bizim çalışmamızda her birinden 20 adet olmak üzere 80 farklı gıda örneğinden (çiğ süt, peynir, çiğ tavuk, et) yaptığımız izolasyon ve tür tanımlamaları sonucunda ise toplam %85 oranında gıdalarda fazla bulundukları bilinen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türleri elde edilmiş ve 60 bakteri izolatının MALDI TOF MS ile 42 tanesi (%70) *E.faecium*, 18 tanesi (%30) *E.faecium* olarak belirlenmiştir. Araştırmamız ve son zamanlarda yapılan çalışmalar *E.faecalis*'in gıdalarda daha kolay üreyip bulaştığını ve izolasyonda *E.faecium*'a göre daha fazla orana sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar neticesinde gıdalardan *E. Faecalis* ve *E. Faecium* türlerinin kolaylıkla ve sıklıkla izole edilen mikroorganizmaların başında geldiği tespit edilmiştir.

Schlegelova ve ark. (2010), et ürünleri ile yaptıkları çalışmada, *Enterococccus* türlerinin kontaminasyona neden olduğunu bildirmişlerdir (Schlegelova ve ark., 2010). Bizim çalışmamızın sonuçları ile bu çalışmanın sonuçları paralellik göstermektedir.

Gomes ve ark. (2008), 120 ham ve pastörize peynir, et ve sebze örneğinde *Enterococcus* varlığını gözlemlemiş ve %52,5 pozitif sonuç bulmuştur (Gomes ve ark., 2008). Çalıştıkları benzer gıdalar ve elde ettikleri sonuçlar bakımından bu çalışma bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Guerrero-Ramos ve ark. (2016) İspanya'da yabani av eti ile yaptıkları çalışmada 55 örneğin tümünden *Enterococcus* izole ederek *E. Faecium* 45 izolat ile en yaygın tür olurken, bunu *E. Faecalis* (7 izolat) ve *E. Durans* (3 izolat) ile takip etmiştir (Guerrero-Ramos ve ark., 2016).

Camargo ve ark. (2014) çalışmasında, 105 gıda örneğinin %95,2'sinden enterokokları izole etmişlerdir. Gıdalarda yüksek *Enterococcus* sıklığı daha önce Kuzey Amerika'da (Hayes ve ark., 2003; Johnston ve Jaykus, 2004), Avrupa'da (Koluman, 2009) ve Latin Amerika'da (Morales ve ark.,2004) yapılan çalışmalarda da görülmüştür (Camargo ve ark., 2014). Fracalanzza ve ark. (2007) et ve süt ürünü olmak üzere 50 numuneyi analiz ettikten sonra bunların %86,6'sının *Enterococcus* pozitif olduğunu gözlemledi. Yüksek oranda bulunan bu *Enterococcus* türleri bizim çalışmamızı desteklemektedir (Fracalanzza ve ark., 2007).

Camargo ve ark.(2014) Brezilya'da farklı süpermarketlerden aldığı kümes hayvanları (35), domuz eti (20), peynir (35) ve sebze (15) örneklerinden elde ettikleri 105 gıda örneğinin

100'ünden (%95,2) *Enterococcus* elde etmişlerdir. *Enterococcus*'lar sebzeden (%73,3), peynirden (%100), kümes hayvanından (%100) ve domuzdan (%95) izole edilmiştir. *E. faecium* en sık izole edilen tür (genel suşların %41,8'i) olmakla beraber bunu %20,3 ile *E. faecalis* izlemiştir (Camargo ve ark., 2014). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Farklı ülkelerden yapılan çalışmalarda ve bizim çalışmamızda, farklı yerlerden alınan çeşitli süt, peynir, tavuk, et ve fermente gıda ürünlerinin *Enterococcus*'ların farklı oranlarda izole edilmesinin nedeni, gıda örneklerinin üretildiği yerden başlayıp satıldığı işletmelere kadar getirilen aşamalarda ve aynı zamanda tüketicilerde gerekli hijyen ve sanitasyon kurallarının yetersiz ve uygunsuz yapıldığı ve sonuçta kontaminasyona ve klinik enfeksiyonlara yol açabildikleri bir kez daha görülmüştür.

Antibiyotiklerin 1950'lerin başında hayvan yemlerinde kullanıldığı için yetiştiricilikte hayvanlara yeterli doz miktarından daha yüksek seviyede ilaç verilmesi ve bu hayvanların ilacın yasal bekleme süresine itaat etmeden kesime verilmesi sonucunda, antibiyotiklerin vücuttan tamamen atılamaması veya tamamen metabolize olmaması durumunda hayvanların doku ve organlarından elde edilen hayvansal gıdalarda antibiyotik kalıntılarına rastlanabilmektedir (Chajecka-Wierzchowska ve ark., 2015).

Enterokokların son zamanlarda neden olduğu enfeksiyonlar hastane enfeksiyonları başta olmak üzere artış göstermiştir. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80-90'nından *E. Faecalis*, %5-15'inden ise *E. Faecium'un* sorumlu olduğu tespit edilerek bunları klinik örneklerin %5'inden izole edilen *E.gallinarum, E.avium, E.casseliflavus* ve *E. Raffinosus* gibi diğer enterokok türleri takip etmektedir.

Enterokoklar üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının yanı sıra endokardit, salpenjit, endometrit, peritonit, safra yolu enfeksiyonları, karın içi abseleri, bakteriyemi bazen menenjit gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler. Çevre şartlarına dayanıklı olup kolay uyum sağlamaları, birçok farklı antibiyotiklere doğal dirençli olmaları ve kolaylıkla yeni direnç geliştirme özelliklerinin olmasından dolayı son yıllarda enterokokların tedavisinde alternatif yöntemler ve ilaçlar konusunda çalışmalara hız verilmiştir.

Bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesi ulusal ve uluslararası bir tehdit olup, özellikle hastane enfeksiyonlarında tedaviyi zorlaştıran, ölüm oranını arttıran önemli bir unsurdur. Bu kapsamda; yoğun bakımlar ön planda olmak üzere gram pozitif bakterilerdeki direncin çok hızlı yayılması, kullanılan antibiyotiklerin hemen hepsine dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına yol açarak riskli ve tehlikeli gelişmeler göstermektedir.

Enterokokal antibiyotik direnci kapsamında yapılan araştırmalar değerlendirilirken ortaya çıkan örüntü, çok ilaca dirençli suşların olası oluşumudur. Enterokokal antibiyotik direnci klinik alana özel olmamakla birlikte gıda endüstrisinde de yaygındır. Hastanelerde veya antibiyotik kullanmadıkları veya yanlış miktarda kullandıkları zaman hastaneye yatırılan insanlarda VRE varlığı, VRE'nin gıda zinciri yoluyla daraltılmış olabileceğini düşündürmektedir. GRE (glikopeptide dirençli enterokoklar), hayvan yeminde avoparsin (yem katkı maddesi olarak kullanılan bir antibiyotik) kullanımı yoluyla gıda zincirinde ortaya çıkabilir. Vankomisine dirençli enterokok (VRE) ilk 1986 yılında İngiltere ve Fransa'dan bildirilmiş ve ardından da ABD'den bildirilmiştir.

Enterokokların duyarlılık dirençlilik testlerine bakıldığı zaman penisilin veya ampisilin antibiyotiklerinin kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır. Ülkemizde yapılan birçok antibiyotik dirençlilik çalışmasında beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterokokların giderek arttığına dikkat çekilerek, bu artışta penisilinlere dirençli, beta-laktamaz üretmeyen suşların önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Sonuçlarımıza göre; peynir, çiğ süt, çiğ tavuk ve et örneklerinden elde edilen toplam 60 *Enterococcus* izolatının dirençlilik oranları incelendiğinde, 58'I (%96,6) ampisiline, 17'si (%28,3) eritromisine, 11'I (%18,3) tetrasikline, 60'I (%100) kloramfenikole, 53'ü (%88,3) siprofloksasine, 60'I (%100) streptomisine, 57'si (%95) gentamisine, 60'I (%100) vankomisine, 54'ü (%90) norfloksasine, 60'I (%100) teikoplanine, 26'sı (%43,3) kanamisine, 42'si (%70) amoksisilin klavulonik asite duyarlı bulunmuştur.

2'si (%3,3) ampisiline, 28'I (%46,6) eritromisine, 49'u (%81,6) tetrasikline, 1'I (%1,6) siprofloksasine, 3'ü (%5) gentamisine, 2'si (%3,3) norfloksasine, 34'ü (%56,6) kanamisine, 18'I (%30) amoksisilin klavulonik asite dirençli bulunmuştur. Kloramfenikol, streptomisin, vankomisin ve 58ort he58nin dirençli izolat bulunmamıştır.

Giao ve ark. (2022) 30 sığır ve 102 domuz örneği ile yaptıkları çalışmada 84 *E. faecalis* ve 48 *E. faecium* izolatının antimikrobiyal duyarlılık profillerini incelemişlerdir. Vankomisin gibi glikopeptitlere dirençli hiçbir izolat bulamamışlardır. Tetrasikline ve eritromisine orta veya yüksek düzeyde dirençlilik, *E. faecium* ile ilgili olarak, eritromisine yüksek direnç (%58) ve *E. faecalis* izolatları ile ilgili olarak, domuzlarda kloramfenikol ve tetrasikline karşı dirençlilik saptamışlardır (Giao ve ark., 2022).

Ülkemizden bildirilen çalışmada Kasımoğlu ve ark. (2010), çalışmasında tavuk örneklerinden izole ettikleri *Enterococccus*'larda eritromisin (%91) ve tetrasiklin (%98) antibiyotiklerine direnç saptamıştır (Kasımoğlu ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda da eritromisin (%46,2) ve tetrasiklin (%81,6) direnci yüksek bulunduğundan bu sonuçlar bizim çalışmamıza parallellik göstermektedir. Vankomisine direnç saptanmaması bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemiştir. Gıda örneklerinde hala vankomisin direncinin tespit edilmesinin, halk sağlığını yüksek oranda tehdit ederek riskli hastalıklara yol açacağını belirtmişlerdir.

Araştırmalarımız sonucunda çeşitli gıda örneklerinden (et ve süt ürünleri) izole ettiğimiz 42 *E.faecium* ve 18 *E.faecium* izolatların disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik dirençliliklerinde bütün izolatların kloramfenikol, vankomisin ve teikoplanine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *E.faecium* türlerinin *E.faecium*'a göre antibiyotiklere daha fazla duyarlı oldukları görülmüştür. *E. Faecalis* ve *E. Faecium* türlerinin en fazla duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla %100 ile kloramfenikol, streptomisin, vankomisin ve teikoplanin, %96,6 ile ampisilin, %95 ile gentamisin, %90 ile norfloksasin, %88,3 ile siprofloksasin ve %70 ile amoksisilin klavulonik asit olarak tespit edilmiştir. En fazla dirençlilik gösterdikleri antibiyotik ise %81,6 ile tetrasiklindir.

42 *Enterococcus faecalis* izolatının en fazla duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla %100 ile kloramfenikol, vankomisin, teikoplanin ve amoksisilin klavulonik asit, %97,6 ile norfloksasin, %95,2 ile ampisilin olarak tespit edilmiştir. En fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik ise %90,4 ile tetrasiklindir.

18 *Enterococcus faecium* türlerinin en fazla duyarlı olduğu antibiyotikler sırasıyla %100 ile ampisilin, kloramfenikol, gentamisin, vankomisin, teikoplanin ve amoksisilin klavulonik

asit, %77,7 ile siprofloksasin olarak tespit edilmiştir. En fazla dirençlilik gösterdiği antibiyotik ise %61,1 ile tetrasiklindir.

Kim ve ark., (2021) Güney Kore'de yaptıkları çalışmada sağlıklı gıda hayvanlarından izole ettikleri türlerden *E.faecalis*'in *E.faecium*'a göre daha sık direnç gösterdiğini saptamıştır.

E. faecalis izolatlarının %50'sinin makrolidlere ve tetrasikline dirençli olduğunu belirtmişlerdir. *E. Faecium*'da bu antimikrobiyallere orta düzeyde bir direnç oranı vardır. Her iki enterokok türü ampisiline karşı çok düşük bir direnç gösterirken tüm izolatların vankomisine duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. Sığırlardan elde edilen *E. Faecium* izolatları

tetrasiklin (%25,9), siprofloksasin (%23,1) ve eritromisin (%19,9) direnç göstermişlerdir. Benzer şekilde, domuz izolatları, eritromisin (%31,5) ve tetrasiklin (%20,1) direnç göstermişlerdir (Kim ve ark., 2021). İzolatların eritromisin ve tetrasikline dirençli olması bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Camargo ve ark. (2014) Brezilya'da farklı süpermarketlerden aldığı kümes hayvanları (35), domuz eti (20), peynir (35) ve sebze (15) örneklerinden elde ettikleri 105 gıda örneğinin 100'ünden elde ettikleri *Enterococcus* türlerinde tüm suşların yüksek düzeyde vankomisin ve gentamisine duyarlı olduğunu, hiçbir izolatının vankomisine direnç göstermediğini sadece kümes hayvanları ve domuz etinden izole edilmiş 2 *E.faecium* suşunun yüksek düzeyde streptomisine dirençli olduğunu tespit etmişlerdir Antibiyotik direncinin coğrafik alanlara göre değiştiğini bildirmişlerdir (Camargo ve ark., 2014).

Guerrero-Ramos ve ark. (2016) İspanya'da yabani av eti ile yaptıkları çalışmada 55 örneğin tümünden *Enterococcus* izole ederek yüksek direnç yüzdelerini eritromisin (%89,1), tetrasiklin (%67,3), siprofloksasin (%92,7) olarak tespit etmişlerdir (Guerrero-Ramos ve ark., 2016). Bu çalışma tetrasiklin ve eritromisin dirençliliği bakımından bizim çalışmamızla paraleldir.

Bazı araştırmalarda gıdalardan izole edilen enterokokların antibiyotik direnç özelliklerinin potansiyel tehdit oluşturmasının yanında virülans faktörleri açısından da incelenmesi

gerektiğinin bu özelliklerin gıda kontaminasyonlarına ve çeşitli klinik sorunlara neden olduklarının vurgusu yapılmaktadır (Sánchez ve ark., 2009; Carlos ve ark., 2010).

Biyofilmler çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere kolaylıkla ayrılmayacak şekilde bağlanmış bir hücre popülasyonu olmalarının yanında biyofilmlerin ortadan kaldırılması çok zordur ve birçok kronik enfeksiyonu beraberinde getirmektedir. Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne göre vücuttaki mikrobiyal enfeksiyonların % 80'inden fazlasını oluşturan biyofilmler tıbbi olarak önemlidir. Biyofilmlerdeki enterokoklar, planktonik olarak büyüyen enterokoklara göre antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Bu durum ele alındığı zaman biyofilm oluşumunun potansiyel etkisi önemli olabilmektedir.

Mohamed ve ark. (2007) yaptığı çalışmada, bir biyofilmin üreteral ve safra stentleri, silikon gastrostomi cihazları ve intravasküler kateterler gibi çeşitli tıbbi cihazlara bağlanma kapasitesinin olduğu enterokokların biyofilm üretme yeteneği olarak değerlendirilmiş ve *E. Faecalis* ve *E. Faecium* tarafından biyomateryaller üzerine yapışması ve üretimi gösterilmiştir (Mohamed ve ark., 2007).

Di Rosa ve diğer araştırmacılar çalışmalarında *E. Faecalis* izolatlarının *E. Faecium'dan* daha sık biyofilm ürettiğini tespit etmişlerdir (Di Rosa, 2006).

Çalışmamızda farklı yerlerden alınan gıda örneklerinden izole edilen 60 adet *Enterococcus* spp. Türü izolatın Kongo Red Agar yöntemiyle bakılan biyofilm aktivitesi sonuçlarına göre 36'sı (%60) zayıf biyofilm, 22'si (%36,6) orta kuvvetli, 2'si (%3,3) kuvvetli bulunmuştur. Kuvvetli biyofilm oluşturan bakteri türlerinden ikisi de *Enterococcus faecium* sonucunu vermiştir. Çalışmamızda kuvvetli ve orta biyofilm aktivitesinin olması çalışılan gıdalarda hijyen ve sanitasyon kurallarına daha çok dikkat edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Mikroplak yöntemiyle yapılan biyofilm aktivite sonuçlarımıza göre ise 37^{o}C'de 48 saat inkübasyon süt örneklerinde 595 nm 'de en yüksek biyofilm değeri *Enterococcus faecalis*'te 2,211 ve en düşük biyofilm değeri *Enterococcus faecium*' da 0,022'dir.

Bu çalışmalar sonucunda *E. Faecalis* türlerinin *E.faecium* türlerine göre daha sık biyofilm ürettiğini ve biyofilm oluşumunun enterokok enfeksiyonunun patogenezinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda izolatlarımızın virülans özelliklerden hemolitik aktivitesine, dnaz aktivitesine, yüzey tabakası varlığına, jelatinaz (62ort), hiyalüronidaz (hyl), hücre duvarı yapışkanlığı (efaA), enterokok yüzey proteini (esp), ve cinsiyet feromon (ccf ve cpd) genlerine bakılmıştır.

60 *Enterococcus* izolatımızın tamamında DnAz aktivitesi görülmüştür. Jelatinaz aktivitesi genotipte görülmesine rağmen fenotipte pozitif sonuç vermemiştir. Hemolitik aktivite açısından 17'si (%28,3) pozitif, 43'ü (%71,6) negatif sonuç vermiştir. Pozitif sonuç verenlerin 14'ü (%82,3) *E.faecalis*, 3'ü (%17,6) *E.faecium*'dur. Yüzey tabakası varlığında izolatların 24'ü (%40) koyu, 22'si (%36,6) orta, 14'ü (%23,3) açık renkte üremiştir. Koyu renk üreyen bakteri türlerinden 4'ü (%16,6) *Enterococcus faecium*, 20'si (%83,3) *Enterococcus faecalis*'tir.

Son olarak 60 *Enterococcus* izolatımızın 58'inde (%96,6) esp, 46'sında (%76,6) efaA, 38'inde (%63,3) ccf, 22'sinde (%36,6) 62ort, 11'inde (%18,3) hyl, 9'unda (%15) cpd geni görülmüştür.

Barbosa ve ark. Yaptıkları çalışmada 76 *Enterococcus* izolatlarından 3 (%3,9) tanesinde esp, 52 (%69,3) tanesinde 62ort geni bulmuşlardır. Fenotipte %26.4 jelatinaz aktivitesi bulmuşlardır. Bu çalışma bizim çalışmamızda jelatinazın fenotip aktivitesi görülmemesine rağmen paralellik göstermektedir (Barbaso ve ark. 2010).

Camargo ve ark. (2014) Brezilya'da farklı süpermarketlerden aldığı kümes hayvanları (35), domuz eti (20), peynir (35) ve sebze (15) örneklerinden elde ettikleri 105 gıda örneğinin 100'ünden elde ettikleri *Enterococcus* türlerinin *E.faecium*'da %72'sinde hemoliz aktivitesi, çoğu tavuk etinden elde edilen *E. faecalis* türlerine ait olmakla birlikte %20 jelatinaz üretimi tespit edilmiştir (Camargo ve ark., 2014). Araştırmamız sonucunda jelatinaz üretimi genotipte sonuç verdiği halde fenotipte gözlemlenmemiştir. Hemoliz aktivitesini gözlemlediğimiz için bu çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızla paraleldir.

Medeiros ve ark. Çalışmasında gıda izolatlarının %56,4'ünde biyofilm oluşumu, klinik örneklerinin %74,2'sinde hemolitik aktivite, %77,7 oranında 62ort ve %34,8 oranında esp geni gözlemlemişlerdir. (Medeiros ve ark., 2014). Bu çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Anderson ve ark. (2016) 97 *E. Faecalis* izolatlarının tamamında efaA, %99'unda 63ort, %70,5'inde esp tespit etmiş olup hiçbir izolatta hyl genine rastlamamışlardır. Örneklerin %3,3'ünde jelatinaz aktivitesi, klinik izolatların %46,6'sında, gıda izolatlarının %13,3'ünde hemolitik aktivite görülmüştür. Bu sonuçlar fenotipte jelatinaz aktivitesi görülmesi dışında bizim diğer sonuçlarımızı desteklemektedir (Anderson ve ark., 2016).

Igbinosa ve Beshiru (2019) hazır deniz mahsullerinden (soslu, haşlanmış ve füme karides) elde ettikleri 17 (%28,8) *E.faecalis* ve 29 (%49,2) *E.faecium* türünden 63ort'yi 18 (%30,5), cpd'yi 36 (%61), ccf'yi 56 (%94,9), efaA'yı 46 (%77,9), esp'yi 58 (%98,3) ve hyl'yi 44 (%74,6) oranında ve biyofilm oluşumunu tespit ederek bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir (Igbinosa ve Beshiru, 2019).

Semedo ve ark. (2021) çalışmalarında 34 *Enterococcus* izolatında tetrasiklin direncini 14 (%87,5), eritromisin direncini 10 (%55,6) bulmuşlardır. Hemolitik aktiviteyi 10 *E.faecium* izolatının 6'sında (%60) tespit etmişlerdir. Jelatinaz aktivitesini 11 *E.faecalis* izolatının 9'unda (%81,8), 10 *E.faecium* izolatının 6'sında (%60) gözlemlemişlerdir. 10 E.*faecalis* izolatında 7 (%70), 10 *E.faecium* izolatının tamamında 63ort tespit etmişlerdir. Hiçbir izolatta esp geni gözlemlememişlerdir. Bu sonuçlar fenotipte jelatinaz aktivitesinin bulunması ve esp geninin gözlenmemesi dışında sonuçlarımızla paraleldir.

El-Zamkan ve Mohamed (2021) mastitisli koyun sütü ve keçi sütünden elde ettikleri *Enterococcus* izolatlarından 63ort 78,4%, esp 32,4% oranında tespit ederek hyl genini hiç gözlemlemişlerdir (El-Zamkan ve Mohamed, 2021). El-Zamkan ve Mohamed'in çalışmaları sonucunda hyl geninin hiç gözlenmemesi, 63ort ve esp geninin tespit edilmesi ve oranları bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Chajecka ve ark., (2017) perakende çiğ (20 numune), pişmiş (20 numune) ve yenmeye hazır karideslerden (20 numune), cinsiyet feromonlarını kodlayan genlerden cpd'yi (%100) ve ccf'yi (%94.3) yüksek oranda bulmuşlardır. Yüksek oranda 63ort tespit etmişlerdir (Chajecka ve ark., 2017). Bu çalışma, bizim çalışmamızda 63ort oranının düşük olması bakımından desteklemese de cpd ve ccf genlerinin görülmesi açısından bizim sonuçlarımızla paraleldir.

Guerrero-Ramos ve ark. (2016) İspanya'da yabani av eti ile yaptıkları çalışmada 55 *Enterococcus* izolatından 4 gelE (%7,3), 6 cpd (%10,9), 3 esp (%5,5), 1 hyl (%1,8) geni tespit etmişlerdir. 55 enterokoktan 15'inin (%27,3) en az bir virülans faktör geni taşıdığını saptamışlardır. *E. Faecium* izolatlarının %20'si bir veya daha fazla virülans geni taşırken *E. Faecalis* izolatları için bu oranı %71,4'ü bulmuşlardır (Guerrero-Ramos ve ark., 2016). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Türkiye'de Yılmaz ve ark. (2016) perakende sığır ve tavuk eti örneklerinden izole ettikleri enterokoklarda en yaygın virülans belirleyicilerini cpd (%100 ve %92,4) ve ccf (%98 ve %99) olarak tespit etmiştir (Yılmaz ve ark., 2016).

Ülkemizin değişik bölgelerinde ve dünya üzerinde farklı coğrafyalarda yapılan çeşitli çalışmalarda *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* bulunma sıklığı, antibiyotik direnç profili, biyofilm ve virülans faktörleri bizim çalışmamızla yüksek oranda benzerlik göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

En sık tüketilen gıdalar içerisinde bulunan et, süt, et ve süt ürünlerinin yapılması, taşınması veya tüketilmesi aşamalarında kontaminasyon olması durumunda bu gıdaların mikrobiyal çoğalma bakımından uygun bir ortam sağlaması nedeniyle, gıdaların bozulup raf ömürlerinin azalmasına ve önemli kontaminasyonlara neden olmaktadır. Araştırmamızda et ve süt ürünlerine kolaylıkla bulaşan gram pozitif bakteriler olan *Enterococcus* türleri antibiyotik direnci sahip olmalarının ve bu direnç özelliklerinin gıda ve sağlık alanlarında ne gibi sorunlar teşkil ettiğinin analizi yapılmıştır. Ayrıca antibiyotik direncinin yanı sıra hemolitik aktiviteleri, virülans faktörleri, biyofilm oluşturma yeteneklerinin etkisi araştırılmış, en son aşamada sahip olduğu primer genlerinin analizi yapılmıştır. Yaptığımız bu çalışma, gıdada bulunan *Enterococcus*'larda hijyen ve sanitasyon kuralları ve üretimden tüketime kadar uygun çalışma koşulları dikkate alındığında elde edilen sonuçlarla diğer bu konudaki literatür sonuçları arasında yüksek oranda benzerlikler görüldüğü gibi farklılıklar da tespit edilmiştir.

Yayınlanmış diğer çalışmalar değerlendirildiğinde *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'un gıdalarda hem bozulma nedeni hem de starter kültür olarak değerlendirilmesi gerekildiği dikkate alınmalıdır. Birçok klinik vakada kayıt altında tutuldukları için çapraz kontaminasyona nedeni olan patojenik türler olarak insanlardan izole edilmeleri ve bu konuda çalışmalar yapılması bu türler hakkında daha fazla bilgi elde etmemizi sağlayacaktır. Çalışmamız sonucunda da ülkemizde tüketimi yüksek olan çiğ süt, peynir ve çiğ tavuğun bilinçsizce işlenmesi veya tüketilmesi halinde *Enterococcus* ve *Enterococcus* spp. İle kontamine olması durumunda sağlık açısından risk faktörü oluşturabileceği görülmüştür.

Antibiyotikler keşfedildikten sonra enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya başlanılmış ve bu durum halk sağlığı açısından önemli ölçüde bir gelişme göstermiştir. Uzun yıllar boyunca bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmemesi tedavi aşamalarında önemli ve etkili husus olarak görülmekteydi ancak zamanla antibiyotiklerin insanlar tarafından bilinçsiz ve uygunsuz koşullarda kullanılması ciddi boyutlarda olan antibiyotik dirençliliğini de beraberinde getirmiştir.

Ülkemizde ve farklı ülkelerde çeşitli gıdalar ile yapılan çalışmalarda örneklerden *Enterococcus* izolatları elde edilmiştir. Gram pozitif bakterilerin kontaminasyonu sonucu

oluşan enfeksiyon ve klinik hastalıkların tedavisinde ilk zamanlarda antibiyotikler en etkili çözüm yolu iken zamanla insanların bilinçsiz şekilde çok fazla antibiyotiklere kullanmaları bu antibiyotiklerin direnç geliştirmelerine sebep olduğu gözlenmiştir.

Enterococcus'lar, enfeksiyona neden olan gram pozitif bakteriler arasında birinci sıralarda yer almaktadır. Bu türlerde zaman geçtikçe bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu artan vankomisin direncinin toplum sağlığı açısından ilerleyen günlerde büyük sorunlara neden olabileceği ve bu artan dirence karşı önlem alınmazsa veya tedavi bulunmazsa klinik anlamda halk sağlığında zorluklar ile yüz yüze gelinecektir.

Mikroorganizmaların direnç profilleri, farklı antibiyotiklere karşı farklı direnç gösterebildiğinden, gıda kontaminasyonu sonucu yaşanabilecek zehirlenmeler ve hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımı daha ve dikkatli bilinçli şekilde yapılmalıdır. Gıda patojenleri, özellikle yaşlılar olmak üzere hastanede tedavi gören hastalar ve immün sistemi zayıf olanlar için çok büyük tehlike arz ettiğinden özellikle bu kişilerde ve halk sağlığında uygun tedavi yöntemlerinin daha faydalı olacağı görülmektedir. Bu nedenler ve olaylar göz önüne alındığında hastanın tedavisinde bakterilerin duyarlı olduğu antibiyotiklerin kullanılması daha doğru olacaktır.

Günümüzde *Enterococcus*'lara üzerinde etki gösteren vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri, gereksiz kullanıldıkları zaman VRE sıklığının artışına ve tedavide seçenek kısıtlamasına neden olurlar ve plazmidler, transpozonlar ve genetik mutasyonlar aracılığıyla glikopeptit grubu antibiyotiklere zaman içerisinde direnç geliştirirler. Bu sebeple glikopeptid antibiyotiklerin insan sağlığını tehdit eden enfeksiyonlarda kullanılması doğru bir tercih olarak belirtilmektedir. İnsanlar, hastalıklarda doğru ve uygun antibiyotik kullanımına prosedürlerde belirlenen kurallara göre bilinçlendirilmeli ve bu uygulama hastalıkların önüne geçmek için zorunlu hale getirilmelidir. Bu uygulama ve bilinçlilik hareketi ile antibiyotiklerin gereksiz yere uygun olmayan koşullarda bile kullanımı veya yanlış kullanımı azaltılarak dünyada kullanılan toplam antibiyotik tüketimi en aza indirgenebilir ve bu durum neticesinde bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç oluşumu önlenebilir. Çalışmamızda gıda ürünlerinden izole edilen *E.faecium* ve *E.faecium* türlerininde vankomisin dirençinin saptanmamış olması sevindiricidir. Ancak bu bakterilerde enterokokal yüzey proteinleri (esp), jelatinaz (66ort) ve hücre duvarı yapışkanlığı (efaA), cinsiyet feromonları (ccf ve cpd) ve hiyalüronidaz (hyl) gibi virülans karakterlerini ve

biyofilm oluşumunu saptamış olmamız halk sağlığı açısından önemli olduklarını göstermiştir. Bu nedenle çiğ süt ve peynir ürünlerinin üretim aşamasından tüketiciye ulaştığı aşamaya kadar olan tüm basamaklarda gıdalarda önem arz eden ve birincil kural olan hijyen ve sanitasyon kurallarına dikkat edilmesi gerekmektedir. Gıda üretim ve saklama gibi basamakların hijyen kurallarına uygun şekilde ve özenli yapılması gerekmektedir.

Bu çalışma ile normal floranın fırsatçı patojenleri olan *Enterococcus*'ların neden olduğu insanlarda, nozokomiyal kan dolaşımı, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, yumuşak doku infeksiyonları ve neonatal sepsis gibi ciddi hastalıklar, bu bakteri türlerinde meydana gelen çapraz kontaminasyon sonucu görülmektedir. Bununla beraber bu mikroorganizmaların gıda zinciri basamaklarındaki yetersiz hijyen sebebi ile insanlarda enfeksiyonlara yol açabileceği bilincinin oluşturulması ve hayvansal gıda tüketiminin daha dikkatli yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

Ayrıca *Enterococcus*'larda, bakterinin patojenitesini etkileyebileceği düşünülen diğer özellikler; hemolitik aktivite, biyofilm oluşumu ve diğer virülans faktörleridir. Bakterinin sahip olduğu bu özellikler ve genler klinik çalışmalardan izole edilen *Enterococcus* izolatlarının yanında gıda kaynaklı izolatlarda da bulunabilirler.

Çalışmalarımız bitiminde sahip olduğumuz sonuçlar ile gıda ürünlerinden izole edilen *Enterococcus*'larda tedavi zorlayıcı etken olan antibiyotik direnliliği ve bakteriye çeşitli özellikler kazandıran virülans genler hakkında bilgiler ortaya konulmuş, direncin oluşmasını engelleme veya oluşan direnci azaltmaya yönelik ileride gıda ve sağlık alanında yapılacak çalışmalara yön vermek hedeflenmiştir. Elde edilen bilgiler kapsamında, direncin gelişiminin önlenmesinin klinik alanlarda önemi, gıda üretimi yapan yerler ve hayvancılık işletmelerinde kontrollü üretim yapılması, bilinçli antibiyotik kullanılması gerekliliği ön plana çıkarılarak ülke ekonomisi ve toplumun refah düzeyinin ve sağlık durumunun arttırılması ile yaygın ve olumlu bir etki sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Alçay, A. (2019). İstanbul'da satılan pişmiş tavuk dönerlerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırılması, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 49(2), 74-85.

Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prevost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., and Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic ıdentification of lactic acid bacteria ısolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, 22(5), 373-382.

Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. (2016). *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1534.

Barbosa, J., Gibbs, P. A., and Teixeira, P. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21(5), 651-656.

Ben Braïek, O., and Smaoui, S. (2019). Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed Research International*, 1-13.

Bernoth, E. M. (1990). Autoagglutination, growth on tryptone-soy-Coomassieagar, outer membrane protein patterns and virulence of Aeromonas salmonicida strains. *Journal of Fish Diseases*, 13(2), 145-155.

Beshiru, A., Igbinosa, I. H., Omeje, F. I., Ogofure, A. G., Eyong, M. M., and Igbinosa, E. O. (2017). Multi-antibiotic resistant and putative virulence gene signatures in *Enterococcus* species isolated from pig farms environment. *Microbial pathogenesis*, 104, 90-96.

Bollinger, N., Hassett, D. J., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and McDermott, T. R. (2001). Gene expression in Pseudomonas aeruginosa: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 1990-1996.

Butaye, P., Devriese, L.A., and Haesebrouck, F. (1999). Phenotypic distinction in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains between susceptibility and resistance to growth-enhancing antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 43(10), 2569-2570.

Camargo, C. H., Bruder-Nascimento, A., Lee, S. H. I., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., and Rall, V. L. M. (2014). Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. İsolated from food in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 111-115.

Capita, R., and Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11-48.

Carlos, A. R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, M. T., and Tenreiro, R. (2010). Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of applied microbiology*, 108(5), 1563- 1575.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., and Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). Virulence factors of enterococcus spp. Presented in Food. *LWT*, 75, 670-676.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpińska, M., and Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2015). Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin-phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46, 222-226.

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement.* M100-S21. Wayne, PA, USA, 21-28.

Costa, P. M., Oliveira, M., Bica, A., Vaz-Pires, P., and Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and Escherichia coli isolated from poultry feed and feed ingredients. *Veterinary Microbiology*, 120(1-2), 122-131.

De Vuyst, L., Moreno, M. F., and Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 8*4*(3), 299-318.

Demirtürk, N., ve Demirdal, T. (2004). Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5(2), 17-21.

Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C. R., Montanaro, L., and Baldassarri, L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and. *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters,* 256(1), 145-150.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbiallife on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.

Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulance determinants and potential for genetic exhance between food and medical isolated. *Applied and Enviromental Microbiology*, 67(4), 1628-1635.

Elhadidy, M., and Zahran, E. (2014). Biofilm mediates Enterococcus *faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 58(3), 248-254.

El-Zamkan, M. A., and Mohamed, H. M. (2021). Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in *Enterococcus* species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis. *PloS One*, 16(11), e0259584.

Esel, D., Doganay, M., Bozdemir, N., Yildiz, O., Tezcaner, T., Sumerkan, B., and Selcuklu, A. (2002). Polymicrobial ventriculitis and evaluation of an outbreak in a surgical intensive care unit due to inadequate sterilization. *Journal of Hospital Infection*, 50(3), 170-174.

EUCAST. European Committee on An icrobial Susceptibility Testing. (2015). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.* Version 5.0, valid from (2015-01-01).

Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O., and Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, *74*(7), 4164-4171.

Fallah, F., Yousefi, M., Pourmand, M. R., Hashemi, A., Alam, A. N., and Afshar, D. (2017). Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in Enterococci isolated from urinary tract infections. *Microbial Pathogenesis*, 108, 85-90.

Flemming, H.C and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix, *National Revulotion Microbiology*, 8(9), 623-633.

Fracalanzza, S. A. P., Scheidegger, E. M. D., Santos, P. F. D., Leite, P. C., and Teixeira, L. M. (2007). Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7), 853-859.

Franz C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 105-122.

Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J., and Holzapfel, W.H., (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385-4389.

García-Galaz, A., Pérez-Morales, R., Díaz-Cinco, M., and Acedo-Félix, E. (2004). Resistencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de cerdos al tracto gastrointestinal y efectos antagónicos contra Escherichia coli. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), 5-11.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T. M., Condon, S., and Swings, J. (2002). Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3560-3565.

Ghosh, A., and Zurek, L. (2015). Antibiotic resistance in enterococci: A food safety perspective. *In Antimicrobial resistance and food safety*. London: Academic Press, 155-180.

Gião, J., Leão, C., Albuquerque, T., Clemente, L., and Amaro, A. (2022). Antimicrobial Susceptibility of Enterococcus Isolates from Cattle and Pigs in Portugal: Linezolid Resistance Genes optrA and poxtA. *Antibiotics*, 11(5), 615.

Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 163-171.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215-222.

Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., and Zdovc, I. (2019). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *BioMed Research International*, 1155.

Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., and De Martinis, E. C. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. İsolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25(5), 668-675.

Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Leveidiotou, S., and Papadopoulou, C., (2010) Antimicrobial Resistance of Major Foodborne Pathogens from Major Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(1):1-5.

Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C., and Capita, R. (2016). Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiology*, 53, 156-164.

Gundoğan, N., and Avcı, E. (2014). Occurrence and antibiotic resistance of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus in raw milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), 562-569.

Guzman Prieto, A. M., van Schaik, W., Rogers, M. R., Coque, T. M., Baquero, F., Corander, J., and Willems, R. J. (2016). Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones?. *Frontiers in Microbiology*, 7, 788.

Gün, İ., ve Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda,* 34(3), 165-173.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., and Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1791.

Hayes, J. R., English, L. L., Carter, P. J., Proescholdt, T., Lee, K. Y., Wagner, D. D., and White, D. G. (2003). Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7153-7160.

Hugas, M., Garriga, M., and Aymerich, M. T. (2003). Functionalty of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 223-233.

Hummel, A., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. S*ystematic and Applied Microbiology*, 30(1), 1-7.

Igbinosa, E. O., and Beshiru, A. (2019). Antimicrobial resistance, virulence determinants, and biofilm formation of *Enterococcus* species from ready-to-eat seafood. *Frontiers in Microbiology*, 10, 728.

Igbinosa, I. H., Beshiru, A., Egharevba, N. E., and Igbinosa, E. O. (2020). Distribution of Enterobacteria in Ready-to-Eat Food in Cafeterias and Retail Food Outlets in Benin City: Public Health Implications. *Journal of Community Medicine and Prim Health Care*, 32(2), 80-94.

İnat, G. (2008). Pastırma üretiminde kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi ve iyileştirme koşullarının araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(1-2), 53-59.

İspirli, H., Demirbaş, F., and Dertli, E. (2017). Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT*, 75, 358-365.

İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., and Yıldırım, M. (2008). Identification and izolation of lactic acid bacterium having antimicrobial activity from traditionaly produced cheese. *Journal of the Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, 25(1), 1-6.

Jeong, J. Y., Jo, Y. H., Kim, S. B., Liu, Q., Lee, J. W., Mo, E. J., and Lee, M. K. (2015). Pancreatic lipase inhibitory constituents from Morus alba leaves and optimization for extraction conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(11), 2269-2274.

Jett, B. D., Huycke, M. M., and Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 462-478.

Johnston, L. M., and Jaykus, L. A. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3133- 3137.

Kanemitsu, K., Nishino, T., Kunishima, H., Okamura, N., Takemura, H., Yamamoto, H., and Kaku M. (2001). Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *Journal of Microbiological Methods*, 47(1), 11-16.

Karataş, A. (2005). *Beyaz peynir ve fermente sucuklardan Enterococcus faecium'un izolasyonu ve tanımlanması*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 67-71.

Keeratipibul, S., Oupaichit, T., and Techaruwichit, P. (2009). Contamination profiles of Escherichia coli and enterococci in steamed chicken meat products. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1821-1829.

Khan, M. A., Northwood, J. B., Loor, R. G. J., Tholen, A. T. R., Riera, E., Falcon, M., and Hays, J. P. (2010). High prevalence of ST-78 infection-associated vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asuncion, Paraguay. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 624-627.

Kim, M. H., Moon, D. C., Kim, S. J., Mechesso, A. F., Song, H. J., Kang, H. Y., and Lim, S. K. (2021). Nationwide surveillance on antimicrobial resistance profiles of enterococcus *faecium* and *enterococcus faecalis* isolated from healthy food animals in South Korea, 2010 to 2019. *Microorganisms*, 9(5), 925.

Kinley, B., Rieck, J., Dawson, P., and Jiang, X. (2010). Analysis of Salmonella and enterococci isolated from rendered animal products. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(1), 65-73.

Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, *88*(2-3), 123-131.

Kodeksi, T. G. (2011). *Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği.* RG, 29(2011), 28157.

Koluman, A., Akan, L. S., and Çakiroğlu, F. P. (2009). Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*, 20(3), 281-283.

Koneman, E. W., Allen, S. D., and Janda, M. W. (1997). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiolgy*, (5th edition.), New York, 200-203.

Lauková, A., Focková, V., and Pogány Simonová, M. (2021). Enterococcal species associated with Slovak raw goat milk, their safety and susceptibility to lantibiotics and Durancin ED26E/7. *Processes*, 9(4), 681.

Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007.

Litopoulou-Tzanetaki, E. (1990). Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *Journal of Food Science*, 55(1), 111-113.

Lukasova, J., and Sustackova, A. (2003). Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Vet. Brno*, 72, 315-323.

Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., and Aymerich, T. (2005). Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1177-1190.

Medeiros, A. W., Pereira, R. I., Oliveira, D. V. D., Martins, P. D., d'Azevedo, P. A., Van der Sand, S., and Frazzon, A. P. G. (2014). Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 327-332.

Mohamed, J. A., and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), 1581-1588.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24.

Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., and Pfaller, M. A. (2009). *Klinik Mikrobiyoloji* (Çev. A. Başustaoğlu, A. Kubar, Ş T. Yıldıran ve M. Tanyüksel) Ankara: Atlas Kitapçılık, (Eserin orjinali 1970'de yayımlandı), 390-1258.

Nasiri, M., and Hanifian, S. (2022). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in pasteurized milk: Prevalence, genotyping and characterization of virulence traits. *LWT*, 153, 112452.

Nes, I. F., Diep, D. B., and Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1189-1198.

Omar, N. B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M., Franz, C. M., and Gálvez, (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 118-130.

Oruc, O., Cetin, O., Darilmaz, D. O., and Yüsekdag, Z. N. (2021). Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses. *LWT*, 148, 111741.

Oryaşın, E. (2008). *Çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilen Enterococcus'ların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının tespiti.* Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Ozcimen, M., Kurtoglu, M. G., Goktas, S., Omeroglu, E., Sakarya, Y., Alpfidan, I., and Saglam, F. (2016). Daptomycin versus vancomycin in an *Enterococcus faecalis* endophthalmitis rabbit model. *Current Eye Research*, 41(2), 232-239.

Özmen Togay, S., and Karayiğit, Ş. (2022). Screening of antibiotic resistance and virulence genes of enterococcus spp. Strains isolated from Urfa cheese. *Journal of Agricultural Sciences*.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65(2), 859-86.

Pavia, M., Nobile, C. G., Salpietro, L., and Angelillo, I. F. (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *Journal of Food Protection*, 63(7), 912-915.

Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G., and Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 311-314.

Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., and de Valdez, G. F. (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 241-245.

Sağlam, D., and Şeker, E. (2016). Food-borne bacterial pathogens. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(2), 105-113.

Sanlibaba, P., and Senturk, E. (2018). Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1955-1963.

Sayıner, H. S. (2008). *Hastanemizde sürveyansla saptanan VRE'lerin dağılımı. antibiyotiklere duyarlılıkları ve kolonize hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi.* Yüksek Lisans Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.

Schlegelova, J., Babak, V., Holasova, M., Konstantinova, L., Necidova, L., Šišák, F., and Jaglic, Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech Journal of Food Sciences*, *28*(5), 450-461.

Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., and Barreto Crespo, M. T. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569-2576.

Semedo-Lemsaddek, T., Bettencourt Cota, J., Ribeiro, T., Pimentel, A., Tavares, L., Bernando, F., and Oliveira, M. (2021). Resistance and virulence distribution in enterococci isolated from broilers reared in two farming systems. *Irish Veterinary Journal, 74*(1), 1-10.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891- 899.

Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M., and Marciňáková, M. (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Veterinary Microbiology*, 132(3-4), 293-301.

Šustáčková, A., Nápravníková, E., and Schlegelová, J. (2004). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. *Folia Microbiologica*, 49(4), 411-417.

Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., and Lanorte, M. T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 267-274.

Theilacker, C., Kaczynski, Z., Kropec, A., Fabretti, F., Sange, T., Holst, O., and Huebner, J. (2006). Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are direct against ipoteichoic acid. *Infection and Immunity*, 74(10), 5703-5712.

Theilacker, C., Sanchez-Carballo, P., Toma, I., Fabretti, F., Sava, I., Kropec, A., and Huebner, J. (2009). Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 71(4), 1055-1069.

Toğay, S. Ö., ve Temiz, A. (2011). Gıda kaynaklı enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi. *Gıda*, 36(5), 303-310.

Toğay, S.Ö., Keskin, A.Ç., Açık, L., and Temiz, A. (2010). Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 1084-1092.

Tuncer, Y. (2009). Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7008-7009.

Valenzuela, A. S., ben Omar, N., Abriouel, H., López, R. L., Veljovic, K., Cañamero, M. M., and Gálvez, A. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20(4), 381-385.

Van Reenen, C. A., and Dicks, L. M. (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: What are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193(3), 157-168.

Wayne, P. A. (2011). Clinical and laboratory standards institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 31(1), 100-121.

Yılmaz, E. S., Aslantas, O., Pehlivanlar, S. O., Türkyılmaz, S., and Kürekci, C. (2016). revalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 20-26.

Yu, M. K., Kim, M. A., Rosa, V., Hwang, Y. C., Del Fabbro, M., Sohn, W. J., and Min, K. S. (2019). Role of extracellular DNA in *Enterococcus faecalis* biofilm formation and its susceptibility to sodium hypochlorite. *Journal of Applied Oral Science*, 27.

Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.



GAZİ GELECEKTİR…