



Kasap Dükkanları ve Şarküterilerde Gıda ile Temas Eden Yüzeylerden Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Biyofilm Üretiminin Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu*

Nihat AKYOL^{1,a}, Dursun Alp GÜNDOĞ^{1,b}, Yasin ÖZKAYA^{1,c}, Candan GÜNGÖR^{2,d},
Nurhan ERTAŞ ONMAZ^{2,e}

¹Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kayseri-TÜRKİYE

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

ORCID: ^a0009-0005-4949-371X; ^b0000-0002-1581-1813; ^c0000-0002-4746-5492; ^d0000-0002-4321-2770;
^e0000-0002-4679-6548

Sorumlu yazar: Nurhan ERTAŞ ONMAZ; E-posta: nertas@erciyes.edu.tr

Atif yapmak için: Akyol N, Gündoğ DA, Özkaya Y, Güngör C, Ertaş Onmaz N. Kasap dükkanları ve şarküterilerde gıda ile temas eden yüzeylerden elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin fenotipik ve genotipik karakterizasyonu. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2023; 20(3):198-205

Öz: Bu çalışmada, Kayseri ilindeki kasap ve şarküteri ortamında *Staphylococcus aureus*'un (*S. aureus*) varlığı, elde edilen izolatların biyofilm üretim yeteneklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Ağustos-Aralık 2022 tarihleri arasında rastgele seçilen 10 farklı işletmeden toplam 200 örnek elde edilmiştir. *S. aureus* varlığı EN/ISO 6888-1 (01/2004)'da belirtilen metoda ek olarak PCR'da *nuc* geninin belirlenmesiyle tespit edilmiş, biyofilm yeteneği ise Kongo kırmızısı agar (KKA) ve mikroplaka (MP) yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca biyofilm yeteneğine sahip izolatlarda biyofilm ile ilişkili genlerin varlığı yine PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Analiz edilen 200 örneğin 42'si (%21) *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* izolatlarının, beşi bıçak, yedisi kesme tahtası, sekizi kıyma, altısı kuşbaşı, ikisi sucuk, dördü köfte, altısı peynir ve dördü pastırma örneklerine aitti. Çalışmada elde edilen, izolatların tamamının hem KKA'da hem de MP testinde biyofilm pozitif olduğu belirlenirken, MP testine göre izolatların 18 (%43)'ünün güçlü, 13 (%31)'ünün orta derecede ve 11 (%26)'inin zayıf biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. Biyofilm pozitif olarak belirlenen izolatların 18'i (%43) ve 16'sı (%38) analiz edilen genlerden sırasıyla *icaA* ve *icaD* geni taşırken hiçbir izolatın *fnbA* ve *fnbB* genlerini barındırmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, Kayseri ilindeki kasap ve şarküteri ortamından izole edilen *S. aureus*'ların biyofilm üretme yeteneği halk sağlığı açısından tehlike arz etmektedir. Bu nedenle, işletmelerde hijyen koşullarının iyileştirilmesi gıda güvenliği ve tüketiciler için önemlidir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, biyofilm ile ilgili genler, halk sağlığı, hayvansal gıdalar, *S. aureus*

Phenotypic and Genotypic Characterization of Biofilm Production in *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained from Food Contact Surfaces in Butcher and Delicatessen

Abstract: In the present study, it was aimed to investigate the presence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in butcher and delicatessen environments in Kayseri province and analyze their biofilm abilities with phenotypic and genotypic methods. For this study, a total of 200 samples were collected from 10 different businesses, which were randomly selected between August and December 2022. The presence of *S. aureus* was investigated with EN/ISO 6888-1 (01/2004) standard, and the determination of the *nuc* gene in PCR, and its biofilm ability was investigated with Congo red agar (CRA) and microplate method (MP). In addition, the presence of biofilm-related genes in isolates with biofilm ability was also investigated with PCR method. Out of 200 samples, 42 (21%) were identified as *S. aureus*. Of these 42 isolates, 5 belonged to knives, 7 to cutting board, 8 to minced meat, 6 to cubed meat, 2 to sausage, 4 to meatballs, 6 to cheese, and 4 to pastrami. According to CRA and MP tests, all *S. aureus* isolates were detected as biofilm producers, and 18 (43%) of the isolates were strong, 13 (31%) were moderate, and 11 (26%) were weak in the MP test. Out of biofilm producer isolates, *icaA* and *icaD* genes were detected in 18 (43%) and 16 (38%), respectively, while none of the isolates contained *fnbA* and *fnbB* genes. As conclusion, the biofilm production ability of *S. aureus* isolates from the butcher and delicatessen environment in Kayseri are considered as public health risk. Therefore, improving hygienic conditions in food enterprises is essential for food safety and consumer health.

Keywords: Animal origin food, biofilm, biofilm related genes, public health, *S. aureus*

Giriş

Yüksek miktarda protein, yağ, mineral ve vitamin içeren hayvansal gıdalar (et ve et ürünleri, süt ve süt

ürünleri) sağlıklı ve dengeli beslenme açısından büyük önem arz etmektedir (Özlü ve Ercoşkun, 2021). Gıda üretimi amacıyla kullanılan çiftlik hayvanları *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus* gibi pek çok gıda kaynaklı patojen için temel rezervuar durumundadır. Stafilkoklar, üretimi veya

Geliş Tarihi/Submission Date : 13.06.2023
Kabul Tarihi/Accepted Date : 11.09.2023

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TYL-2022-12054 kodlu projeden özetlenmiştir.

depolanması uygun koşullarda yapılmayan, protein açısından zengin besinlerden kaynaklanan, gastrointestinal hastalıkların yaklaşık üçte birinden sorumludur (Paparella ve ark., 2018; Pérez-Boto ve ark., 2023). Stafilokokal gıda zehirlenmeleri, *S. aureus* başta olmak üzere enterotoksijenik özelliğe sahip Stafilokokların gıdalarda veya ortamda 10^6 kob/g veya daha yüksek sayılara ulaşması ile Stafilokokal enterotoksinleri (SE) sentezlemesi sonucu şekillenir. Hastalık, enterotoksinlerin vücuda alınımından sonraki 4-6 saat içinde mide bulantısı, ani kusma, karın ağrısı ve ishal gibi semptomlar ile başlar, bu süreci takip eden 12-24 saat içerisinde kendini sınırlar (Paparella ve ark., 2018; Zeaki ve ark., 2019). Etkenin, gıda zehirlenmesinin yanı sıra, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, pnömoni, endokardit, yara enfeksiyonları gibi nozokomiyal enfeksiyonlara ve bakteriyemiye neden olduğu bildirilmiştir (Kadkhoda ve ark., 2020).

İnsan ve hayvan biotasında doğal olarak bulunan *S. aureus*, düşük su aktivitesi (a_w), yüksek tuz konsantrasyonları ve nispeten düşük pH gibi olumsuz koşullara karşı direnci sayesinde çeşitli gıdalarda canlılığını koruyabilmektedir. Başta metisilin olmak üzere birçok antimikrobiyal ajana karşı kazandığı direnç, salgıladığı toksinler ve biyofilm oluşturma yeteneği

film oluşumunda önemli rol aldığı bilinmektedir (Cramton ve ark., 1999; Maira-Litran ve ark., 2002; Houston ve ark., 2011; Achek ve ark., 2020). Bu nedenle, bu çalışmada, Kayseri ili Talas ilçesi sınırları içerisinde faaliyet gösteren kasap ve şarküterilerde satışa sunulan et ve süt ürünleri ile alet ekipman yüzeylerinden alınan sıvap örneklerinde *S. aureus* kontaminasyon düzeylerinin belirlenmesi ve elde edilen izolatların biyofilm üretim kabiliyetlerinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Kayseri ilinde faaliyet gösteren ve rastgele seçilen 10 farklı kasap ve şarküteride satışa sunulan hayvansal gıdalar ve gıda ile temas eden yüzeylerden alınan örnekler materyal olarak kullanıldı. Bu amaçla, Ağustos-Aralık 2022 tarihleri arasında işletmeler ziyaret edilerek 137 adet hayvansal gıda (30 adet kuşbaşı et, 25 adet kıyma, 19 adet sucuk, 5 adet köfte, 17 adet pastırma, 18 adet tavuk eti, 23 adet peynir) ve 63 adet alet ve ekipman yüzey sıvap (22 adet bıçak, 20 adet kıyma makinası ve 21 adet kesme tahtası) olmak üzere toplam 200 adet örnek analiz edildi. Çalışmada toplanan örneklerin işletmelere göre dağılımı Tablo 1'de detaylandırılmıştır.

Tablo 1. Çalışmada toplanan örneklerin işletmelere göre dağılımı

Örnekler	Ziyaret Edilen Aylar ve Ziyaret Edilen İşletme Kodları										Toplam Örnek Sayısı	
	Aralık		Şubat		Nisan		Haziran		Ağustos			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	I		
Hayvansal Gıdalar	Kuşbaşı	2	3	3	2	3	5	3	4	3	2	30
	Kıyma	2	3	2	2	2	4	2	3	2	3	25
	Köfte	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	5
	Sucuk	2	2	2	2	3	2	1	-	2	3	19
	Pastırma	2	-	1	2	3	2	2	-	2	3	17
	Tavuk Eti	2	3	2	1	1	3	1	2	2	1	18
	Tulum Peyniri	3	2	2	3	2	2	3	2	2	2	23
Ekipman	Bıçak	3	2	3	1	3	1	2	3	2	2	22
	Kıyma Makinası	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Kesim Tahtası	3	2	2	3	2	3	2	1	2	1	21
	İşletme Bazında Toplam Örnek Sayısı	22	19	20	19	21	24	19	17	20	19	200

gibi patojenik özellikleri sebebiyle, hayvansal gıdalarda ve üretim tesislerinde *S. aureus* kontaminasyonu halk sağlığını tehdit etmektedir (Gungor ve ark., 2021). Bakteriler, biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde, dezenfektanlardan, antibiyotiklerden, konakçı bağışıklık sistemi kapsamında salınan enzimlerden ve çevresel stres faktörlerinden korunabilmektedir (Ballah ve ark., 2022). Fibronektin bağlayıcı proteinlerinin (*fnbA* ve *fnbB*) bakterinin konakçı hücreye yapışmasını sağlayarak biyofilm oluşumunu kolaylaştırdığı, hücre içi adezyon (*icaACD*) gen ürünlerinin ise biyo-

Toplanan örneklerde koagülaz pozitif stafilokokların izolasyonu ISO 6888-1 standart prosedürüne (ISO, 1999) göre gerçekleştirildi. Bu amaçla, 10 g et ve peynir örnekleri 90 mL tamponlanmış peptonlu su (TPS) içeren filtrelili numune poşetine (Isolab, Türkiye) eklenecek 2 dk homojenize edildi. Sıvap örneklerinin bulunduğu sıvı besi yeri ise 2-3 dk vortekslemeden sonra besi yerindeki sıvının 1 mL' si 9 mL TPS içeren steril tüplere ilave edilerek 10^{-4} e kadar 10 kat dilüsyonları hazırlandı. Her bir dilüsyon egg yolk tellurit emulsion (Merck, Almanya) içeren Baird Parker Agar'a (Merck, Almanya) yayma plak tekniği ile ekil-

dikten sonra 37°C'de aerobik koşullarda 24-48 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon süresi sonunda besi yerinde tipik olarak üreyen gri-siyah renkte, parlak, konveks, etrafında berrak zon oluşturan koloniler seçildi ve ardından fenotipik identifikasyon testleri (Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri) yapılarak, moleküler identifikasyon amacıyla *nuc* geninin varlığı yönünden analiz edildi.

Konvansiyonel yöntemler ile *S. aureus* olarak izole edilen suşların DNA ekstraksiyon işlemi ticari kit (Instangen, Bio-Rad, ABD) kullanılarak üretici firmasının direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen DNA örnekleri *S. aureus* için spesifik olan *nuc* geninin araştırılması amacıyla PCR'a tabii tutuldu.

Bu amaçla PCR reaksiyon karışımı, 1 x PCR buffer (Thermo, ABD), 2 mM dNTP miks, 1.5 mM MgCl₂ her bir primerden (Tablo 2) 20 pmol, 2U Taq DNA polimeraz, 2 µL hedef DNA ve 2.5 µL distile su içeren karışım total hacim 25 µL olacak şekilde hazırlandı. PCR reaksiyonu termal döngüleme cihazında (Thermo, ABD) 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 56°C'de 1 dk primer bağlanması, 68°C'de 1 dk primer uzaması aşamalarını kapsayan 30 siklus ve sonunda 72°C'de 7 dk ilave son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. PCR işlemi sonucunda elde edilen amplikonlar, % 1.5'lik agaroz jele yüklendikten sonra 120 V'ta 60 dk elektroferez (Thermo EC330) işlemine tabii tutuldu. Daha sonra jel UV jel görüntüleme sisteminde (Biorad Gel Doc XR, ABD) görüntülendi (Gungor ve ark., 2021).

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primerler

Hedef Gen	Primer	Primer Sekansı (5'-3')	Baz büyüklüğü	Kaynak
<i>nuc</i>	nuc-F	AGTTCAGCAAATGCATCACA	400 bp	Cremonosi ve ark. (2007)
	nuc-R	TAGCCAAGCCTTGACGAACT		
<i>icaA</i>	<i>icaA</i> -F	TCTCTTGAGGAGCAATCAA	188 bp	Arciola ve ark. (2002)
	<i>icaA</i> -R	TCAGGCACTAACATCCAGCA		
<i>icaD</i>	<i>icaD</i> -1	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG	198 bp	
	<i>icaD</i> -2	CGTGTTCATCAACATTTAATGCAA		
<i>fnbA</i>	<i>fnbA</i> -1	ACTTGATTTTGTGTAGCCTTTTT	185 bp	Ferreira ve ark. (2013)
	<i>fnbA</i> -2	GAAGAAGCACAAAAGCAGTA		
<i>fnbB</i>	<i>fnbB</i> -1	CGTTATTTGTAGTTGTTTGTGTT	118 bp	
	<i>fnbB</i> -2	TGGAATGGGACAAGAAAAAGAA		

S. aureus izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri ise, koloni morfolojisinin renk değiştirmesi esasına dayanan Kongo kırmızısı agar (KKA) yöntemi (Freeman ve ark., 1989) ve kantitatif bir yöntem olan mikroplak (MP) yöntemi (Stepanović ve ark., 2000) ile araştırıldı.

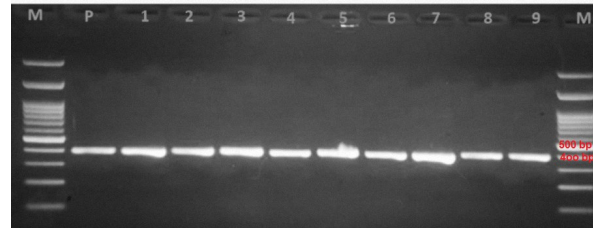
Biyofilm kabiliyetleri tespit edilen izolatların biyofilm ile ilişkili *icaA*, *icaD*, *fnbA* ve *fnbB* genlerinin varlığı daha önceki çalışmalarda tasarlanan oligonükleotid primerler kullanılarak PCR ile belirlendi (Arciola ve ark., 2002; Ferreira ve ark., 2013). Amplifikasyon işlemi 95°C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 95°

C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 7 dk son uzama şeklinde gerçekleştirildi.

Bulgular

Çalışmada analiz edilen 200 örneğin 45'i (%22.5) yapılan konvansiyonel analizler sonucunda koagülaz pozitif stafilokok (KPS) olarak belirlendi.

PCR analizi neticesinde ise konvansiyonel yöntem ile KPS olduğu belirlenen 45 örnekten 42'sinin (%93) *nuc* geni taşıdığı belirlendi (Şekil 1). Dolayısıyla çalışmadaki *S. aureus* prevalansı %21 (42/200) olarak tespit edildi.



Şekil 1. Çalışmada izole edilen *S. aureus* izolatlarında belirlenen *nuc* geninin PCR görüntüsü. M: Marker (100 bp), P: Pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 25923 *nuc* gen: 400 bp), 1-9: *S. aureus* pozitif örnekler.

Çalışma süresince analiz edilen kıyma, kuşbaşı et, sucuk, köfte, peynir ve pastırma, bıçak ve kesme tahtası örneklerini sırasıyla %32 (8/25), %20 (6/30),

%10.5 (2/19), %80 (4/5), %26 (6/23), %23.5 (4/17), %23 (5/22) ve %33 (7/21)'ü *S. aureus* ile kontamine bulundu (Tablo 3). Pozitif örneklerden gıdalarda toplam *S. aureus* sayısı 1×10^1 - 5×10^4 kob/g, alet ve ekipmanlarda ise 1×10^1 - 3×10^2 kob/cm² arasında değişen düzeylerde belirlendi.

Çalışmada, analiz edilen örneklerden elde edilen izolatların tamamı hem KKA besi yerinde hem de MP testinde biyofilm pozitif olarak belirlendi. MP testinde *S. aureus* izolatlarının 18 (%43)'ünün güçlü, 13 (%31)'ünün orta derecede ve 11 (%26)'inin zayıf biyofilm üreticisi olduğu tespit edildi (Tablo 4).

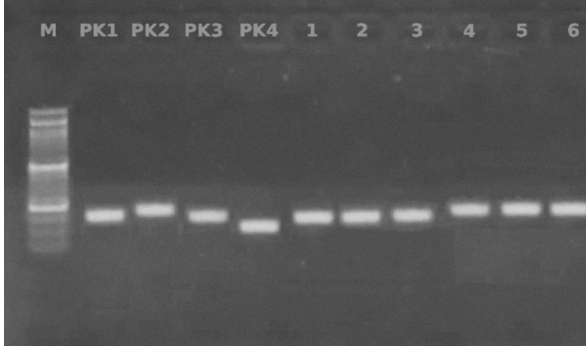
Tablo 3. Çalışmada analiz edilen örneklerde *S. aureus* dağılımı

Analiz Edilen Örnek (n)	S. aureus Pozitif Örnek sayısı / (%)										Toplam (%)	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	İ		
Kuşbaşı (n=30)	1	1	1	-	-	-	-	2	-	-	1	6 (%20)
Kıyma (n=25)	-	1	-	1	1	2	-	1	1	1	1	8 (%32)
Köfte (n=5)	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1	-	4 (%80)
Sucuk (n=19)	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2 (%11)
Pastırma (n=17)	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	1	4 (%24)
Tavuk Eti (n=18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peynir (n=23)	1	-	1	-	1	1	1	-	-	1	-	6 (%26)
Bıçak (n=22)	1	1	-	-	-	-	1	2	-	-	-	5 (%23)
Kıyma Mk. (n=20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kesme Tahtası (n=21)	1	1	-	1	1	1	1	-	-	1	-	7 (%33)
Toplam (n=200)	5 (%2.5)	4 (%2)	3 (%1.5)	4 (%2)	4 (%2)	4 (%2)	5 (%2.5)	5 (%2.5)	4 (%2)	4 (%2)	4 (%2)	42 (%21)

Tablo 4. Çalışmada elde edilen biyofilm üretme yeteneğindeki *S. aureus* izolatlarının işletme ve örneklere göre dağılımı

<i>S. aureus</i> pozitif Örnek	<i>S. aureus</i> pozitif İşletme	<i>S. aureus</i> pozitif izolatların MP'da biyofilm oluşturma özelliği			Biyofilm ile ilişkili genler			
		Güçlü	Orta	Zayıf	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>
Kuşbaşı	A	+	-	-	+	-	-	-
	B	-	+	-	-	-	-	-
	C	-	-	+	-	-	-	-
	H	+	+	-	+	+	-	-
	I	+	-	-	+	-	-	-
Kıyma	B	-	+	-	-	+	-	-
	D	+	-	-	+	-	-	-
	E	-	+	-	-	-	-	-
	F	+	-	+	+	+	-	-
	H	-	+	-	-	-	-	-
	I	+	-	-	-	-	-	-
	i	-	-	+	-	-	-	-
Köfte	C	-	+	-	+	-	-	-
	D	+	-	-	-	+	-	-
	G	-	+	-	-	+	-	-
	I	+	-	-	+	-	-	-
Sucuk	E	-	-	+	-	-	-	-
	i	+	-	-	+	-	-	-
Pastırma	A	+	-	-	+	-	-	-
	D	+	-	-	-	+	-	-
	G	-	+	-	-	+	-	-
	i	+	-	-	+	-	-	-
Peynir	A	-	-	+	-	-	-	-
	C	-	+	-	-	+	-	-
	E	+	-	-	-	+	-	-
	F	-	+	-	-	+	-	-
	I	+	-	-	+	-	-	-
Bıçak	A	+	-	-	+	-	-	-
	B	-	+	-	-	+	-	-
	G	-	-	+	-	+	-	-
	H	+	+	-	+	+	-	-
Kesme Tah-tası	A	+	-	-	+	-	-	-
	B	-	-	+	-	-	-	-
	D	-	-	+	-	+	-	-
	E	+	-	-	+	-	-	-
	F	-	-	+	-	-	-	-
	G	-	+	-	-	+	-	-
I	I	-	-	+	-	+	-	-

PCR analizinde biyofilm pozitif izolatların 18 (%43)'i *icaA* ve 16 (%38)'si *icaD* geni için pozitif bulunurken izolatların hiç birisinde *fnbA* ya da *fnbB* geni tespit edilmedi (Tablo 4, Şekil 2).



Şekil 2. *S. aureus* izolatlarında tespit edilen biyofilm ilişkili genlerin PCR görüntüsü. M: Marker (100 bp), PK1: Pozitif kontrol (*icaA* geni: 188 bp), PK2: Pozitif kontrol (*icaD* geni: 198 bp), PK3: Pozitif kontrol (*fnbA* geni: 185 bp), PK4: Pozitif kontrol (*fnbB* geni: 118 bp), 1-3: *icaA* geni pozitif *S. aureus* izolatlar, 4-6: *icaD* geni pozitif *S. aureus* izolatlar.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma kapsamında analiz edilen 200 örneğin % 21'inin (42/200) *S. aureus* ile kontamine olduğu belirlendi. Analiz edilen kuşbaşı et, kıyma, köfte, pastırma, sucuk ve peynir örneklerinde *S. aureus* sayısı sırasıyla, 1×10^1 - 3×10^2 , 1×10^1 - 5×10^4 , 2×10^3 - 8×10^3 , 1×10^1 - 8×10^1 , 5×10^1 - 2×10^4 ve 1×10^2 - 5×10^3 kob/g aralığında tespit edildi. Analiz edilen örneklerden peynir ve pastırmalardaki bakteri sayısının Türk Gıda Kodeksinde (TGGK 2011) belirtilen limitleri aşmadığı görüldü. Bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde Guven ve ark. (2010), Aydın ve ark. (2011), El-Azzouny ve ark. (2018) ve Koçak Kızanlık (2019), analiz ettikleri hayvansal orjinli gıda örneklerinin sırasıyla %33, %9.7, %12 ve %10'unun *S. aureus* ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlarımızın aksine, Tang ve ark. (2017) ve Seyoum ve ark. (2018), analiz ettikleri örneklerde sırasıyla %68 ve %47'sinden *S. aureus* izole etmişlerdir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların nedeni, örnekleme yapıldığı yer, örnek sayısı, coğrafi bölgeler arasındaki farklılıklar, örneklerin niteliği, örneklerin muhafaza koşulları, işlenme şekilleri ve uygulanan analiz metotları ile ilgili olabilir (Normanno ve ark., 2007; Guven ve ark., 2010; Borena ve ark., 2023). Çalışma kapsamında ziyaret edilen kasap ve şarküterilerde çalışan personelin önlük, maske, bone ve eldiven kullanımını göz ardı ettikleri gözlemlendi. Bu işletmelerde çalışan personel hijyen kurallarını yerine getirmediği taktirde tüketiciye sunulan ürünlerin çapraz kontaminasyonu riski kaçınılmaz hale gelecektir.

Çalışma kapsamında işletmelerdeki ekipmanlardan, bıçak örneklerinin %23'ünde 1×10^1 - 2×10^4 kob/cm² ve kesme tahtasının %33'ünün 7×10^1 - 4×10^2 kob/cm² düzeylerinde *S. aureus* ile kontamine olduğu belirlendi. Bu sonuçlar ziyaret edilen işletmelerde et ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan ekipman yüzeylerinin

hijyeninin yetersiz olduğunu ve bu yüzeylerin çapraz kontaminasyon kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, Güzel ve Onmaz (2022) toplu yemek tüketimi yapılan bir tesiste analiz ettikleri bıçak, kıyma makinası ve doğrama tezgâhı örneklerinde sırasıyla %43, %6 ve %18.5'inde çeşitli düzeylerde (ortalama 3.5×10^1 - 1.6×10^3 kob/cm²) *S. aureus* izole ederken, Tiryaki (2018) ise 190 adet ekipmandan alınan örneklerin hiçbirinde *S. aureus* belirlemediğini bildirmiştir.

Patojen mikroorganizmaların gıdalarda ve gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği, etkenin patogeneğinde oldukça önemli yere sahiptir. Biyofilm oluşturma yeteneğinde olan mikroorganizmalar, olumsuz çevresel koşullara karşı dirençli hale gelerek gıda ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesini önemli ölçüde azaltarak gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından risk oluşturur (Turhan ve Erginkaya, 2019). Yapılan literatür taramasında, hayvansal gıdalardan izole edilen *S. aureus*'ların çeşitli düzeylerde biyofilm üreticisi olduğu bildirilmiştir (Thiran ve ark., 2018; Miao ve ark., 2019; Achek ve ark., 2020; Chen ve ark., 2020; Kowalska ve ark., 2020; Uyanık ve ark., 2022). Bu çalışmada, izolatların %43'ünün güçlü, %31'ünün orta derecede ve %26'sının zayıf biyofilm üreticisi olduğu belirlendi. Ayrıca biyofilm pozitif izolatların %43'ünün ve %38'inin biyofilm oluşumda önemli role sahip olan sırasıyla *icaA* ve *icaD* geni içerirken, hiçbirinde *fnbA* ve *fnbB* genleri belirlenemedi. Çalışmamızdan farklı olarak Vergara ve ark. (2009) ve Achek ve ark. (2020) biyofilm üreticisi olan *S. aureus*'ların *icaA*, *icaD*, *fnbA* ve *fnbB* genlerinin tamamını taşıdığını bildirmişlerdir. Vergara ve ark. (2009) *fnbB* geninin biyofilm üreten izolatlarda saptanmadığı ya da düşük düzeylerde saptandığı rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışma Kayseri ilinde faaliyette bulunan kasap ve şarküterilerde, hayvansal gıda ürünleri ve ekipman yüzeylerinde, biyofilm üretme yeteneğine sahip *S. aureus*'un varlığını ortaya koymuştur. Elde edilen *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme yeteneklerinden dolayı ısı işlem, düşük pH, kurutma gibi işlemlere, dezenfektan ve antibiyotiklere daha dirençli hale gelerek gıda endüstrisinde devamlı kontaminasyon için potansiyel bir kaynak olabilirler. Bu durum çalışmada ziyaret edilen işletmelerde satışa sunulan et ve süt ürünlerinin güvenliği ve dolayısıyla tüketici sağlığı açısından önemli sağlık risklerine neden olabilir. Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumunun önlenmesinde en önemli adım bakterilerin yüzeye tutunmalarını önlemektir. Bu nedenle bu işletmelerde hijyen ve sanitasyon koşullarının iyileştirilmesi önem arz etmektedir. Konu ile ilgili olarak bu perakende üretim ve satış yerlerinde çalışan kasap ve diğer personele HACCP, İyi Üretim Uygulamaları (GMP) gibi gıda sanitasyon uygulamaları ile ilgili eğitim programları düzenlenerek farkındalık oluşturulmalıdır.

Teşekkür: TYL-2022-12054 no'lu proje ile bu tez çalışmasının yapılmasındaki katkılarından dolayı Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Achek R, Hotzel H, Nabi I, Kechida S, Mami D, Di-douh N, Tomaso H, Neubauer H, Ehricht R, Monnecke S, El-Adawy H. Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in Algeria. *Pathogens* 2020; 9(2):153.
- Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomater* 2002; 23(21): 4233-9.
- Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. *Int J Food Microbiol* 2011; 148(2): 99-106.
- Ballah FM, Islam MS, Rana ML, Ullah MA, Ferdous FB, Nelay FH, Levy S, Sobur MA, Rahman AT, Khatun MM, Rahman M, Rahman T. Virulence determinants and methicillin resistance in biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from various food sources in Bangladesh. *Antibiotics* 2022; 11(11): 1666.
- Borena BM, Gurmessa FT, Gebremedhin EZ, Sarba EJ, Marami LM. *Staphylococcus aureus* in cow milk and milk products in Ambo and Bako towns, Oromia, Ethiopia: Prevalence, associated risk factors, hygienic quality, and antibiogram. *Int Microbiol* 2023; 26: 513-27.
- Chen Q, Xie S, Lou X, Cheng S, Liu X, Zheng W, Zheng Z, Wang H. Biofilm formation and prevalence of adhesion genes among *Staphylococcus aureus* isolates from different food sources. *Microbiologyopen* 2020; 9(1): e00946.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; 67(10): 5427-33.
- Cremonesi P, Perez G, Pisoni G, Moroni P, Morandi S, Luzzana M, Brasca M, Castiglioni B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45 (6): 586-91.
- El-Azzouny MM, El-Demerdash AS, Seadawy HG, Abou-Khadra SH. Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*) and thyme (*Zataria multiflora* Boiss) extracts on some food borne pathogens and their effect on virulence gene expression. *Cell Mol Biol* 2018; 64(10): 79-86.
- Ferreira FA, Souza RR, de Sousa Moraes B, de Amorim Ferreira AM, Américo MA, Fracalanza SE, Dos Santos Silva Couceiro JN, Sá Figueiredo AM. Impact of *agr* dysfunction on virulence profiles and infections associated with a novel methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) variant of the lineage ST1-SCCmec IV. *BMC Microbiol* 2013; 27: 93.
- Freeman DJ, Falkner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42: 872.
- Gungor C, Barel M, Dishan A, Disli HB, Koskeroglu K, Onmaz NE. From cattle to pastirma: Contamination source of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) along the pastirma production chain. *LWT* 2021; 151: 112-30.
- Güven K, Mutlu MB, Gulbandilar A, Cakir P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. *J Food Saf* 2010; 30(1):196-212.
- Güzel N, Onmaz NE. Toplu yemek üretimi yapan bir işletmede personel ve gıda temas yüzeylerinin mikrobiyolojik yönden değerlendirilmesi. *Erc Üniv Vet Fak Derg* 2022; 19(3): 189-94.
- Houston P, Rowe SE, Pozzi C, Waters EM, O'Gara JP. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* 2011; 79(3): 1153-65.
- ISO 6888-1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and Other Species)—Part 1: Technique Using Baird-Parker Agar Medium, 1999.
- Kadkhoda H, Ghalavand Z, Nikmanesh B, Kodori M, Houri H, Taghizadeh Maleki D, Karimi Bavandpour A, Eslami G. Characterization of biofilm formation and virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolates from paediatric patients in Tehran, Iran. *Iran J Basic Med Sci* 2020; (5): 691-8.
- Koçak Kızanlık P. Çeşitli kaynaklardan izole edilen *Staphylococcus aureus*'ün bazı virulens özelliklerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Adnan Menderes

- Üniv, Sağlık Bil Enst, Aydın, 2019.
- Kowalska J, Maćkiw E, Stasiak M, Kucharek K, Postupolski J. Biofilm-forming ability of pathogenic bacteria isolated from retail food in Poland. *J Food Protect* 2020; 83(12): 2032-40.
- Maira-Litrán T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, Goldmann DA, Pier GB. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* 2002; 70(8): 4433-40.
- Miao J, Lin S, Soteyome T, Peters BM, Li Y, Chen H, Su J, Li L, Li B, Xu Z, Shirliff ME, Harro JM. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* under food heat processing conditions: First report on CML production within biofilm. *Sci Rep* 2019; 9(1): 1312.
- Normanno G, Corrente M, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *Int J Food Microbiol* 2007; 117(2): 219-22.
- Özlü S, Ercoşkun H. Et ve sağlıklı beslenme. *Gıda ve Yem Bil Tekn Derg* 2021; 25: 15-29.
- Paparella A, Serio A, Rossi C, Mazzarrino G, López CC. Food-Borne transmission of staphylococci. Savini V. eds. In: *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. Academic Press, 2018; pp.71-99.
- Pérez-Boto D, D'Arrigo M, García-Lafuente A, Bravo D, Pérez-Baltar A, Gaya P, Medina M, Arqués JL. *Staphylococcus aureus* in the processing environment of cured meat products. *Foods* 2023; 12(11): 2161.
- Seyoum B, Kefyalew H, Abera B, Abdela N. Prevalence, risk factors and antimicrobial susceptibility test of *Staphylococcus aureus* in bovine cross breed mastitic milk in and around Asella town, Oromia regional state, southern Ethiopia. *Acta Tropica* 2018; 177: 32-6.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; 40: 175-9.
- Tang Y, Larsen J, Kjeldgaard J, Andersen PS, Skov R, Ingmer H. Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark. *Int J Food Microbiol* 2017; 249: 72-6.
- Tebliğleri, TGK. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. TC Tarım ve Orman Bakanlığı, Resmi Gazete, Tarih, (28157), 2011: 2001-19.
- Thiran E, Di Ciccio PA, Graber HU, Zanardi E, Ianieri A, Hummerjohann J. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *J Dairy Sci* 2018; 101(2): 1000-12.
- Tiryaki C. Toplu tüketim işletmelerinde tüketime hazır gıdalar ve ilgili personelde *S. aureus* prevalansı ile bazı virulens özelliklerin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniv Sağlık Bil Ens, İstanbul, 2018.
- Turhan EÜ, Erginkaya Z. Bakteriyel biyofilmlerdeki antimikrobiyel direnç mekanizması. *Akademik Gıda* 2019; 17(1): 131-9.
- Uyanık T, Bölükbaş A, Gücükoğlu A, Çadırcı Ö. Çeşitli gıda örnekleri ve kesimhanelerden izole edilen bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğinin araştırılması. *J Vet Bio Sci Tech* 2022; 7(3): 338-45.
- Vergara-Irigaray M, Valle J, Merino N, Latasa C, García B, Ruiz de los Mozos, Solano C, Toledo-Arana A, Penades JR, Lasa I. Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect Immun* 2009; 77(9): 3978-91.
- Zeaki N, Johler S, Skandamis PN, Schelin J. The role of regulatory mechanisms and environmental parameters in staphylococcal food poisoning and resulting challenges to risk assessment. *Front Microbiol* 2019; 12(10): 1307.