



Mezbaha Atık Sularından İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinin Moleküler Karakterizasyonu*

Nuri GÜNGÖR^{1, a}, Dursun Alp GÜNDOĞ^{1, b}, Candan GÜNGÖR^{2, c}, Nurhan ERTAŞ ONMAZ^{2, d}

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: ^a0009-0006-8049-0987; ^b0000-0002-1581-1813; ^c0000-0002-4321-2770; ^d0000-0002-4679-6548

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

Atıf yapmak için: Güngör N, Gündoğ DA, Güngör C, Ertaş Onmaz N. Mezbaha atık sularından elde edilen *Enterococcus* türlerinin moleküler karakterizasyonu. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2024; 21(1):55-64

Öz: Bu çalışmada, siğir mezbahası atık suyunun (MAS) önemli bir halk sağlığı riski yaratan antibiyotik dirençli *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türlerinin çevreye salınımında olası bir kaynak olarak rolünün araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, büyükbaş hayvan mezbahalarından temin edilen 106 adet MAS örneğinden konvansiyonel metot ile izole edilen *Enterococcus* spp. suşları kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) ile konfirme edildi ve konvansiyonel PCR ile karakterize edildi. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Çalışmada MAS örneklerinden elde edilen 95 (%89.6) enterokok izolatının 33'ü (%34.7) *E. faecalis* ve 10'u (%10.5) ise *E. faecium* olarak tanımlandı. *E. faecalis* izolatlarının Quinupristin-dalfopristine, rifampin, tetrasiklin ve eritromisine karşı direnç oranları sırasıyla %90, %88, %75 ve %63 olarak belirlenirken *E. faecium* izolatlarının ilgili antibiyotiklere direnç oranları ise sırasıyla %90, %100, %80 ve %80 olarak belirlendi. Fakat, linezolid (%90), vankomisin (\geq %70) ve penisilin (>%90) *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarına karşı yüksek etkinlik gösterdi. Ayrıca *E. faecalis* izolatlarının 26'sı (%79), *E. faecium* izolatlarının tamamı (%100) çoklu antibiyotik direnci (ÇAD) gösterdi ve bu izolatların sırası ile %84'ünün ve %100'ünün ÇAD indeksleri 0.2'den yüksek idi. Sonuç olarak, analiz edilen MAS'ların tıbbi açıdan önemli antimikrobiyallere karşı yüksek oranda çoklu direnç sergileyen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatları için bir rezervuar görevi görebileceği ve bu organizmaların çevreye ve insanlara kolonizasyonunda önemli rol alabileceği tespit edildi. Bu nedenle, zengin mikrobiyotaya sahip MAS'ların halk sağlığı ve çevre üzerine olumsuz etkilerin en aza indirilmesi için uygun arıtma stratejileri uygulanmalıdır.

Anahtar kelimeler: *E. faecalis*, *E. faecium*, halk sağlığı, mezbaha atık suyu

Molecular Characterization of *Enterococcus* Species Isolated from Slaughterhouse Wastewater

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the role of cattle slaughterhouse wastewater (SWW) as a possible source of the antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains that pose a significant public health risk. For this purpose, *Enterococcus* spp. strains isolated by conventional method from 106 SWW samples obtained from cattle slaughterhouses were confirmed by quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR) and characterized by conventional PCR. Their antimicrobial susceptibilities were determined with disc diffusion method. Out of the 95 (89.6%) enterococci isolates, 33 (34.7%) were identified as *E. faecalis* and 10 (10.5%) as *E. faecium*. While *E. faecalis* isolates were resistant to Quinupristin-dalfopristin, rifampin, tetracycline and erythromycin at the rates of 90%, 88%, 75% and 63%, respectively; the resistance rates of *E. faecium* isolates to the relevant antibiotics were determined as 90%, 100%, 80% and 80%, respectively. However, linezolid (90%), vancomycin (\geq 70%), and penicillin (>90%) showed high efficacy against *E. faecalis* and *E. faecium* isolates. Additionally, 26 (79%) of the *E. faecalis* isolates and all (100%) *E. faecium* isolates exhibited multiple drug resistance (MDR) and their multiple antibiotic resistance (MAR) indexes were greater than 0.2 for 84% and 100% of these isolates, respectively. In conclusion, the analyzed SWWs can serve as a reservoir for *E. faecium* and *E. faecalis* isolates that exhibit high resistance to medically significant antimicrobials, and they can play a critical role in colonization on the environment and humans. Therefore, appropriate treatment strategies should be applied to minimize the negative effects of SWWs with rich microbiota on public health and environment.

Key words: *E. faecalis*, *E. faecium*, public health, slaughterhouse wastewater

Giriş

İnsan ve hayvanların barsak mikrobiyotasında doğal olarak bulunan Enterokoklar farklı çevre koşullarına

karşı yüksek toleranslarından dolayı her yerde bulunabilen (ubiküter) mikroorganizmalardır (Solaiman ve ark., 2022; Kwit ve ark., 2023). Bazı suşları probiyotik etkilerinden dolayı, bağıışıklık sistemini destekleyici faktör olarak (diyet takviyesi veya terapötik uygulama) ve ayrıca gıda endüstrisinde starter kültür olarak da kullanılırlar (Krawczyk ve ark., 2021; Kwit ve ark., 2023). Ancak fırsatçı mikroorganizmalar olarak ko-

Geliş Tarihi/Submission Date : 18.10.2023

Kabul Tarihi/Accepted Date : 19.12.2023

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TDK-2021-11343 kodlu projeden özetlenmiştir.

nakçının bağıışıklılığının azalması durumunda bakteriyemi, endokardit, yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları gibi patolojik durumlara da yol açabilir (Kwit ve ark., 2023). *Enterococcus* cinsine ait 60'tan fazla tür bilinmektedir ve *E. faecalis* ile *E. faecium* en yaygın izole edilen türler olup (Dec ve ark., 2020;

aseptik olarak steril şişeler alınarak gerçekleştirildi. Her mezbaha ziyaretinde toplanan örnekler etiketlenerek soğuk zincir altında ertesi gün laboratuvara getirilerek analizleri yapıldı. Çalışma kapsamında toplanan MAS örneklerinin ziyaret dönemleri ve kesimhanelere göre dağılımı Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. Çalışma süresince alınan MAS örneklerinin işletme bazında dağılımı

Ziyaret Edilen Mezbahalar	Ziyaret Dönemlerinde Alınan MAS Örnek Sayısı (n)				
	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Toplam
Mezbaha 1	13	13	13	14	53
Mezbaha 2	13	13	13	14	53
Toplam	26	26	26	28	106

Kwit ve ark., 2023) insanlardaki çoklu ilaca dirençli enterokok enfeksiyonlarının çoğunluğundan sorumludur (Güngör ve ark., 2023). Enterokoklar, penisilin, ampisilin ve sefalosporin gibi çeşitli antimikrobiyalere karşı doğal dirençli olmaları ve direnç genlerini plazmid ve transpozonlar aracılığı ile diğer gram pozitif bakterilere aktarmaları nedeni ile özellikle 1980'lerden sonra önemli nozokomiyal patojenlerden biri haline gelmişlerdir (Montealegre ve ark., 2017; Krawczyk ve ark., 2021). Bu bakteriler, biyotik ve abiyotik yüzeylerin kolonizasyonunu kolaylaştıran ve teşvik eden enterokokal yüzey proteini (*Esp*), jelatinaz ve hemolizin gibi virülens faktörlere sahiptirler (Krawczyk ve ark., 2021; Güngör ve ark., 2023). Hastane ortamında ve hayvan çiftliklerinde antibiyotiklerin tedavi ve profilaktik amaçlı kontrolsüz kullanımının, ayrıca hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak antibiyotiklerin kullanımının Enterokoklar arasında kademeli bir direnç oluşumuyla sonuçlandığı bildirilmiştir (Hao ve ark., 2019; Ni ve ark., 2023). Ubikuter özellikte olan antibiyotik dirençli etkenin çevreye yayılmasında en etkili faktörlerden birisi de mezbaha faaliyetleri veya mezbahalardan gelen atık suyun işlenmesi ve bertaraf edilmesidir (Foyle ve ark., 2023). Artan nüfusun et ihtiyacını karşılamak amacıyla mezbahalarda artan kesimler sırasında yüksek miktarlarda atık su üretilmekte ve çevreye salınmaktadır. Enterokoklar arıtılmamış veya yetersiz arıtılmış atık sular aracılığı ile bitki örtüsünü ya da yüzey sularını kontamine ederek doğrudan veya dolaylı olarak insanlara bulaşır ve halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturur (Adegoke ve ark., 2022). Bu nedenle, bu çalışmada, Adana ili sınırları içerisinde faaliyet gösteren iki mezbahadan farklı zamanlarda toplanan mezbaha atık suyu örneklerinde *Enterococcus* spp. prevalansı ve elde edilen izolatların antibiyotik direnç profilleri değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, Adana ilinde faaliyette bulunan iki büyükbaş hayvan mezbahası Nisan-Temmuz 2022 tarihleri arasında iki haftalık periyodik aralıklarla ziyaret edilerek toplam 106 adet mezbaha atık suyu (MAS) toplandı. Örnekleme, kesimi takiben sanitasyon işleminden önce ana giderden 50 mL atık su örneği

Enterococcus spp. izolasyonu

Toplanan örnekler 0.45 µL çapındaki filtreden (Corning Incorporated, Almanya) süzülerek kalıntı ve kaba partiküllerden temizlendi. Filtre edilen MAS'ın 10 mL'si 90 mL Enterococcosel Broth (Becton Dickinson, ABD) ile homojenize edildi ve 35°C'de 24 saat inkübe edilerek ön zenginleştirme işlemine tabi tutuldu. İnkübasyon süresi sonunda, kültürden 100 µL alınarak Enterococcosel agara (Becton Dickinson, USA) yayma plak tekniği ile ekildi ve 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı (Yoon ve ark., 2020). İnkübasyon sonunda üreyen koloniler morfolojik olarak incelendi. Her bir MAS örneği için besiyerinde üreyen siyah haleli bej renkli üçer adet şüpheli koloni kanlı agara (Oxoid CM0271, İngiltere) pasajlanarak saflaştırıldı. Kanlı agarda üreyen koloniler Gram boyama, katalaz testi ve %6.5 NaCl besiyerinde üreme ve eskülin hidrolizi testleri ile doğrulandıktan sonra moleküler analizlere tabi tutuldu (Alipour ve ark., 2014).

DNA ekstraksiyonu

Enterokok şüpheli izolatların toplam genomik DNA (gDNA) izolasyonu, üretici firma tarafından önerilen protokole göre Instagene Genomic DNA Extraction Kit (Bio-Rad, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında elde edilen gDNA'lar da araştırılan genlerin belirlenmesinde kullanılan primerler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primerler

	Hedef Gen	Primer Dizilimi (5'-3')	Baz Büyüklüğü (bp)	Referans
Enterococcus spp.	23SRNA	GAGAAATTCCAAACGAACTTGC CAGTGCTTCTACCTCCATCATT	93	EPA (2015)
E. faecalis	ddl _{E. faecalis}	CACCTGAAGAAACAGGC AT- GGCTACTTCAATTTTCACG	475	Tatsing Foka ve Ateba. (2019)
E. faecium	ddl _{E. faecium}	GCAAGGCTTCTTAGAGA ATCGTGTAAGCTAACTTC	550	Dutka-Malen ve ark. (1995)
Vankomisin Direnci	vanA	GGG AAA ACG ACA ATT GC GTA CAA TGC GGC CGTTA	732	Dutka-Malen ve ark. (1995)
	vanB	ATG GGA AGC CGA TAG TC GAT TTC GTT CCT CGA CC	635	Dutka-Malen ve ark. (1995)
	vanC	GGT ATC AAG GAA ACC TC CTT CCG CCA TCA TAG CT	822	Dutka-Malen ve ark. (1995)

İdentifikasyon

MAS'tan elde edilen ve fenotipik testlerle tanımlanan *Enterococcus* spp. izolatlarının doğrulanması EPA 1611 yönteminde (EPA, 2012) belirtilen kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (q-PCR) kullanılarak yapıldı. Pozitif kontrol olarak, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi kültür koleksiyonuna ait *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları kullanıldı. Reaksiyon karışımı, total hacim 25 µL olacak şekilde 10 µL Green Super-Mix Low ROX (Quanta Biosciences, Inc., Gaithersburg, MD, ABD), her bir primerden 0.5µL (10 pmol), 5µL DNA ve 9µL steril distile sudan oluştu. PCR koşulları, Gerçek Zamanlı PCR Tespit Sistemi (BioRad, CA, ABD) kullanılarak 95°C'de 10 dakika boyunca başlangıç aktivasyon adımını takiben, 95°C'de 15sn, 60°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk'lık 40 döngüyü içeriyordu. Spesifik amplifikasyonu yorumlamak için sürekli floresans ölçümleri altında tüm numuneler için son bir erime eğrisi analizi de yapıldı. Elde edilen izolatlarda *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri DreamTaq Thermo Scientific PCR master miks karışımı kullanılarak konvansiyonel PCR ile karakterize edildi. Özetle, toplam hacim 25 µL olacak şekilde, 12.5 µL 2x Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo, ABD), 6 µL nükleaz içermeyen su, her primerden (25 pmol) 1 µL (Tablo 2) ve 2 µL DNA olacak şekilde PCR reaksiyon karışımları hazırlandı. PCR Reaksiyonu, 94°C'de 3 dk'lık başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 1 dk, 54°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk'lık 30 döngüyü takiben 72°C'de 7 dk'lık son uzama aşamalarında gerçekleştirildi.

İzolatlarda vankomisin direnç genlerinin araştırılması

Çalışmada elde edilen izolatlarda vankomisin direnç genleri ile ilgili olarak *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinin varlığı Dutka-Malen ve ark. (1995)'nin kullandığı metoda göre PCR ile analiz edildi. Bu amaçla PCR reaksiyon karışımı izolatların identifikasyonunda olduğu gibi 2xDream Taq Green PCR Master Mix (Thermo, ABD) kullanılarak hazırlandı. PCR reaksiyonu, 94°C'de 2 dakika boyunca başlangıç denatüras-

yon basamağı, ardından 30 döngü 94°C'de 2dk, 54°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk ve 72°C'de 10 dk son uzatma aşamasından oluştu.

Çalışma kapsamında PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünleri %1.5'luk agaroz jel üzerinde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında (Biorad, Gel Doc XR, ABD) belirlenerek değerlendirildi.

İzole edilen enterokokların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

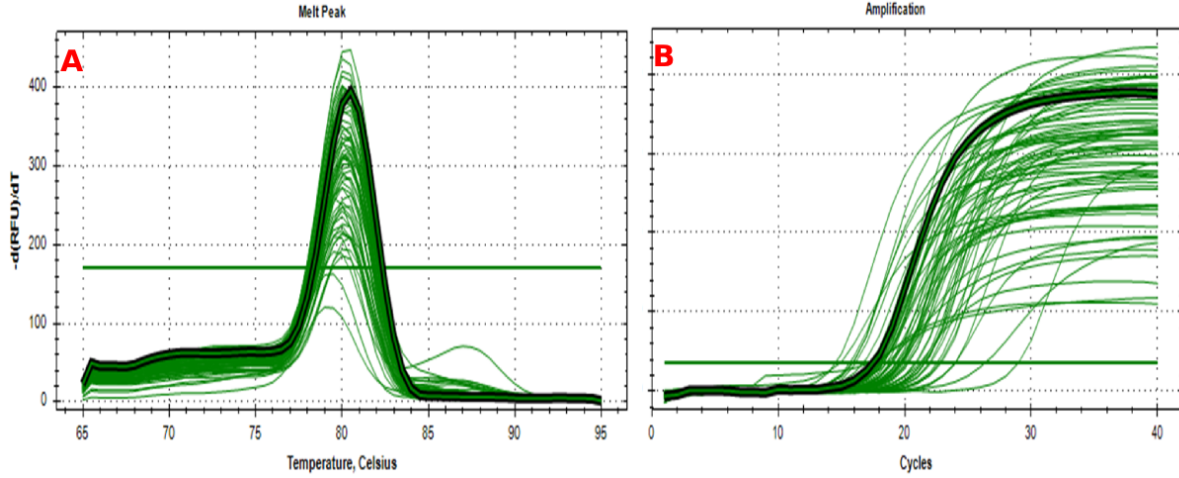
Çalışmada elde edilen enterokok izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları klasik antibiyotik diskleri kullanılarak (Oxoid, İngiltere) disk difüzyon metodu ile belirlendi. Bu amaçla, vankomisin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), linezolid (30 µg), tetrasiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), kloramfenikol (30µg), rifampin (5 µg), quinupristin-dalfopristin (15 µg) ve penisilin (10 IU) antibiyotik diskleri test edildi. Antibiyotik duyarlılık testlerine göre belirlenen zon çapları CLSI'e göre değerlendirildi (CLSI, 2023).

Çoklu antibiyotik direnci (ÇAD) indeksinin belirlenmesi

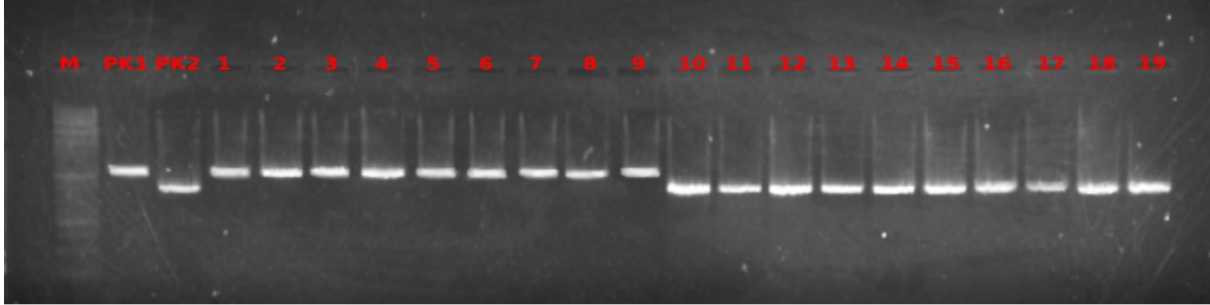
ÇAD indeksi, test izolatların her birinin dirençli olduğu antibiyotik sayısının çalışmada kullanılan toplam antibiyotik sayısına oranı olarak hesaplandı (Mir ve ark., 2022).

Bulgular

Çalışma kapsamında ziyaret edilen mezbahalardan temin edilen 106 MAS örneğinin 95'i (%89.6) yapılan konvansiyonel ve qPCR analizleri sonucunda *Enterococcus* spp. pozitif olarak belirlendi. Yapılan qPCR analizinde *Enterococcus* spp. pozitif izolatların DNA'ları kullanılan primerler ile 14.47-28.95'a kadar Cq değerleri ile başarılı bir şekilde amplifiye edildi (Resim 1A). PCR ürününü analiz edilen izolatların genomik DNA'larının erime sıcaklığı 79.5-80.5°C aralığında belirlendi (Resim 1B).



Şekil 1. SYBR Green qPCR tahlili ile tespit edilen amplifikasyon (A) ve erime eğrileri (B).



Şekil 2. Çalışma kapsamında analiz edilen örneklerden ele edilen izolatlarının PCR görüntüsü. **M:** Marker (50 bp), **PK1:** Pozitif kontrol (*Enterococcus faecium*: 550 bp), **PK2:** Pozitif kontrol (*Enterococcus faecalis*: 475 bp), **1-9:** *E. faecium* pozitif izolatlar, **10-19:** *E. faecalis* pozitif izolatlar.

Elde edilen izolatların 33'ü (%34.7) *E. faecalis*, 10'u (%10.5) ise *E. faecium* (Resim 2) olarak tanımlanırken kalan 52 (%54.7) izolat tür düzeyinde tanımlanamadı. İzole edilen enterokok türlerinin ziyaret edilen mezbahalara göre dağılımı Tablo 3'te belirtildi.

75 ve *E. faecium* için %80) ve eritromisine (*E. faecalis* için %63 ve *E. faecium* için %80) yüksek oranda direnç gösterdiği tespit edildi. Siprofloksasine direnç ise *E. faecium*'da yüksek iken (%70), *E. faecalis*'de nispeten daha düşüktü (%27). Çalışmada elde edilen

Tablo 3. Enterokok izolatlarının ziyaret edilen mezbahalara göre dağılımı

Ziyaret edilen mezbaaha	İzole edilen <i>Enterococcus</i> spp. sayısı (%)	<i>E. faecalis</i> (%)	<i>E. faecium</i> (%)
Mezbaaha 1 (n=53)	49 (92.4)	18 (36)	7 (14)
Mezbaaha 2 (n=53)	46 (86.7)	15 (32)	3 (6)
Toplam (n=106)	95 (89.6)	33 (34.7)	10 (10.5)

E. faecalis izolatlarının 31'i (%94), *E. faecium* izolatlarının tamamı (%100) test edilen antibiyotiklerden en az birine direnç gösterdi (Tablo 4). *E. faecalis* izolatlarının 26'sının (%79), *E. faecium* izolatlarının tamamının (%100) çalışmada test edilen antibiyotiklerden üç ya da daha fazlasına karşı direnç sergileyerek çoklu antibiyotik (ÇAD) direnci gösterdiği belirlendi. İzolatların Quinupristin-dalfopristine (*E. faecalis* ve *E. faecium* için %90), rifampine (*E. faecalis* için %88 ve *E. faecium* için %100), tetrasikline (*E. faecalis* için %

E. faecalis *E. faecium* izolatlarının vankomisine fenotipik olarak sırasıyla %3 ve %20 oranlarında dirençli oldukları belirlendi (Tablo 4), fakat bu izolatlarda vankomisin direnci ile ilgili *vanA*, *vanB* ya da *VanC* genlerinden hiçbiri tespit edilemedi. Ayrıca, *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının ÇAD indeksi sırasıyla 0.2-0.6 ve 0.3-0.6 aralığında olduğu belirlendi (Tablo 5).

Tablo 4. Enterokok izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik	Disk Difüzyon Zon Çapları (mm) (CLSI 2023)										Enterococcus spp. n=52(%)													
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R						
CIP	≥ 21	16-20	≤ 15	7(21)	17(51)	9(27)	0	3(30)	7(70)	27(52)	20(38)	5(9)	E. faecalis n=33(%)	E. faecium n=10(%)										
E	≥ 23	14-22	≤ 13	0	12(36)	21(63)	0	2(20)	8(80)	24(46)	21(40)	7(13)												
TE	≥ 19	15-18	≤ 14	8(24)	0	25(75)	2(20)	0	8(80)	39(75)	3(6)	10(19)												
QD	≥ 19	16-18	≤ 15	2(6)	1(3)	30(90)	1(10)	0	9(90)	18(35)	3(6)	31(59)												
RA	≥ 20	17-19	≤ 16	1(3)	3(9)	29(88)	0	0	10(100)	29(56)	1(2)	22(42)												
P	≥ 15	-	≤ 14	31(94)	0	2(6)	10(100)			48(92)	-	4(7)												
VA	≥ 17	15-16	≤ 14	30(90)	2(6)	1(3)	7(70)	1(10)	2(20)															
CHL	≥ 18	13-17	≤ 12	15(45)	2(6)	16(48)	5(50)	0	5(50)	47(90)	2(4)	3(5)												
LNZ	≥ 23	21-22	≤ 20	30(90)	3(9)	0	9(90)	1(10)	0	49(94)	3(6)	0												

CIP: Siprofloksasin, **E:** Eritromisin, **TE:** Tetrasiklin, **QD:** Quinupristin-Dalfopristine, **RA:** Rifampin, **P:** Penisilin, **VA:** Vankomisin, **CHL:** Kloramfenikol, **LNZ:** Linezolid, **S:** Duyarlı, **I:** Orta derece dirençli, **R:** Dirençli

Tablo 5. Enterekok izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ve ÇAD indeksleri

İzolat Kodu	İzole edilen Enterokok Türü	Antibiyotik Direnç Profili ^a	ÇAD İndeksi=a/b
1	<i>E. faecalis</i>	QD, RA	0.22
2	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, RA, CHL	0.55
3	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, CHL, P	0.55
4	<i>E. faecalis</i>	TE, QD, RA	0.33
5	<i>E. faecalis</i>	TE, QD, RA	0.33
6	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA	0.44
7	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, QD, RA	0.55
8	<i>E. faecalis</i>	TE, QD, RA	0.33
9	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
10	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
11	<i>E. faecium</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
12	<i>E. faecium</i>	E, QD, RA	0.33
13	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
14	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
15	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
16	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
17	<i>E. faecalis</i>	QD, RA	0.22
18	<i>E. faecium</i>	CIP, E, TE, QD, RA	0.55
19	<i>E. faecium</i>	E, CIP, RA, VA	0.44
20	<i>E. faecalis</i>	TE, QD, RA	0.33
21	<i>E. faecalis</i>	TE, CIP, QD, RA, VA	0.55
22	<i>E. faecalis</i>	QD, RA	0.22
23	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
24	<i>E. faecium</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
25	<i>E. faecium</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
26	<i>E. faecium</i>	CIP, E, TE, QD, RA	0.55
27	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66
28	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, CHL	0.44
29	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
30	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
31	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA	0.44
32	<i>E. faecalis</i>	QD, RA	0.22
33	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA	0.44
34	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, QD, RA, CHL	0.55
35	<i>E. faecium</i>	TE, QD, RA	0.33
36	<i>E. faecalis</i>	E, QD, RA, CHL	0.44
37	<i>E. faecalis</i>	CIP, E, TE, QD, RA, P	0.66
38	<i>E. faecalis</i>	QD, RA	0.22
39	<i>E. faecalis</i>	E, TE, QD, RA, CHL	0.55
40	<i>E. faecium</i>	TE, QD, RA, CHL, VA	0.55
41	<i>E. faecium</i>	CIP, E, TE, QD, RA, CHL	0.66

a: bir izolatın dirençli olduğu antibiyotik sayısı, **b:** test edilen toplam antibiyotik sayısı, **CIP:** Siprofloksasin, **E:** Eritromisin, **TE:** Tetrasiklin, **QD:** Quinupristin-Dalfopristine, **RA:** Rifampin, **P:** Penisilin, **VA:** Vankomisin, **CHL:** Kloramfenikol

Tartışma ve Sonuç

Mezbaha atık suları, hayvancılıkla ilişkili ve klinik önemi olan çoklu ilaca dirençli bakteriler için önemli

bir rezervuardır ve çevreye salınımlarıyla birlikte birçok patojen bakterinin kolonizasyonu (örn. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. gibi genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Enterobac-*

teriaceae, *Listeria* spp., metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve vankomisine dirençli Enterokoklar insan ve çiftlik hayvanları için risk oluşturabilir (Sib ve ark., 2020). İşlenmiş hayvan sayısının fazla olması nedeniyle, mezbahalardaki farklı üretim aşamalarından gelen sular, ESKAPE (*E. faecium*, *S.aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) bakterisinin kaynaklarını temsil etmektedir. Bu patojenlerden *E. faecium*, mezbaha ortamında ve mezbaha atık sularında bulunabilir (Güngör ve ark., 2023) ve arıtılmamış veya yetersiz arıtılmış atık sularla kirlenen sulama suları aracılığı ile önemli halk sağlığı sorunlarına neden olabilir (Igbinosa ve Raje, 2019; Hembach ve ark., 2022).

Bu çalışma kapsamında analiz edilen MAS örneklerinin %89.6 'sının *Enterococcus* spp. ile kontamine olduğu belirlendi. Elde edilen izolatların % 34.7'si *E. faecalis*, %10.5'i ise *E. faecium* olarak tanımlandı. Türler arasındaki oransal fark, *E. faecalis*'in diğer Enterokok türlerine oranla olumsuz çevre koşullarını (safra tuzları, dezenfektanlar, pH değişiklikleri ve yüksek ısı gibi) tolere etme yetenekleri daha fazla olması ile açıklanabilir (Hancock ve Gilmore 2000). Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalar MAS örneklerinde *E. faecalis* izolasyon oranının *E. faecium*'a göre daha fazla olduğunu göstermektedir (Güngör ve ark., 2023; Igbinosa ve ark., 2021; Olawale ve ark., 2020; Savin ve ark., 2021). Çalışma kapsamında ziyaret edilen işletmelerin kesim proseslerinde kullanılan sistemlerin yarı otomatik olduğu, abdomen organlarının manuel olarak görevli personel tarafından çıkarıldığı, özofagus ve rektum halkası kullanmadıkları, bu nedenler ile rumen ve barsak içeriğinin zaman zaman doğrudan mezbaha atık suyuna karıştığı gözlemlendi. Bu durum çalışmanın gerçekleştirildiği mezbahalarda, kesim prosesi süresince *Enterococcus* spp. haricinde bir çok patojen bakterinin atık suya geçme suretiyle toprağa, bitkiye, insan ve hayvanlara kolonize olma potansiyelini ortaya koymaktadır. Genel olarak, çalışmada elde edilen *E. faecium* izolatlarının *E. faecalis* izolatları ile kıyaslandığında test edilen antibiyotiklere daha fazla direnç gösterdiği belirlendi. *E. faecium* izolatlarının tamamı ve *E. faecalis* izolatlarının ise %79'u ÇAD idi. Benzer şekilde, daha önce yapılan çalışmalarda atık sularda yüksek oranlarda ÇAD Enterokoklar rapor edilmiştir (Gotkowska-Płachta, 2021; Jannati ve ark., 2023).

Ayrıca, mevcut çalışmada *E. faecium* izolatlarının tamamı (%100) ve *E. faecalis* izolatlarının 26'sı (% 84) 0.2'den yüksek bir ÇAD indeksi (0.3-0.6 aralığında) gösterirken, 5 (%16) *E. faecalis* izolatının ÇAD indeksi ise 0.2 olarak belirlendi. Antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı bir kaynaktan gelen mikroorganizmalarda ÇAD indeksinin 0.2'den büyük, antibiyotikler seyrek kullanıldığı ya da hiç kullanılmadığı kaynaklarda ise bu indeksin 0.2'ye eşit veya daha küçük olduğu

bildirilmiştir (Mir ve ark., 2022). Bu yüzden, çalışmamız MAS'tan elde edilen izolatların çoğunluğunun antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı kaynaklardan elde edildiğini ve dolayısıyla gıda güvenliği, çevre ve halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada analiz edilen izolatlar en yüksek oranda Quinupristin-dalfopristin (%90) ve rifampine (*E. faecalis* için %88 ve *E. faecium* için %100) karşı direnç sergiledi. Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli kaynaklardan izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatları arasında Quinupristin-dalfopristin direnci % 10-%52 (Carey ve ark., 2016; Xuan ve ark., 2021; Solaiman ve ark., 2022), rifampin direnci %60-%100 (Adeniji ve ark., 2021; Solaiman ve ark., 2022; Jannati ve ark., 2023) arasında rapor edilmiştir. Quinupristin-dalfopristin bir streptogramin kombinasyonudur ve insanlarda vankomisine dirençli *E. faecium* enfeksiyonları için önemli bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Streptogramin içeren preparatlar, hayvan yemlerinde uzun yıllardan beri bir büyüme destekleyicisi olarak yaygın kullanılmaktadır (Xuan ve ark., 2021); bu durum, çalışma kapsamında mezbaha atık sularından elde edilen izolatlarda Quinupristin-dalfopristin direncinin yüksek olmasının nedeni olabilir. Rifampisin, enterokokların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için rutin olarak kullanılmasa da türlerin genellikle bu antimikrobioyale karşı kazanılmış direnç gösterdiği bildirilmiştir (Paschoalini ve ark., 2023).

Mevcut çalışmada, eritromisin ve tetrasikline karşı enterokok türlerinde belirlenen direnç profilinin (%63-%80) daha önce yapılan çalışma sonuçları uyumlu olduğu gözlemlendi (Zaheer ve ark., 2020; Xuan ve ark., 2021; Mwikuma ve ark., 2023). Fakat, Kim ve ark. (2021) elde ettikleri enterokok izolatlarında eritromisin direnci bu çalışma sonuçlarından farklı olarak oldukça düşüktü. Bu çalışmada elde edilen izolatlarda eritromisin ve tetrasiklin antibiyotiklerine yüksek oranda direnç sergilemesi, muhtemelen bu antibiyotiklerin çalışmanın gerçekleştirildiği bölgede veteriner hekimliği alanında tedavi ve profilaktik amaçlı yaygın ve kontrolsüz kullanımı ya da yem katkı maddesi olarak bilinçsiz uygulamaların bir yansıması olabilir. Önceki çalışmalar penicillin ve ampisiline (Gagetti ve ark., 2019; Paschoalini ve ark., 2023) çoğunlukla *E. faecium*'un, *E. faecalis*'ten daha dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak bizim çalışmamızda *E. faecalis* izolatlarının penisiline %6 oranında direnç sergilerken *E. faecium* izolatlarının tamamı duyarlı olarak belirlendi. Türlerle bağlı olarak Enterokokların, betalaktam antibiyotiklere zayıf bağlanan düşük afiniteli penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP'ler) eksprese ederek penisilinlere karşı içsel direnç veya azalmış doğal duyarlılık sergiledikleri bildirilmiştir (Paschoalini ve ark., 2023).

Daha önce dünyanın birçok yerinde gerçekleştirilen

diğer geniş ölçekli araştırmaların sonuçlarına benzer şekilde, bu çalışmada *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının linezolid ve vankomisine karşı duyarlı olduğu belirlendi (Maleki ve ark., 2021; Xuan ve ark., 2021; Jannati ve ark., 2023; Paschoalini ve ark., 2023). Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde etkili antibiyotikler olarak önemini koruyan linezolid ve vankomisine karşı direnç gıda ve hayvan kökenli enterokoklarda nadir olarak rapor edildiği bildirilmiştir (Xuan ve ark., 2021).

Sonuç olarak, bu çalışma bulguları Adana ilindeki büyükbaş hayvan mezbahalarına ait atık sularında *E. faecium* ve *E. faecalis*'in prevalansı ve bu izolatların antimikrobiyal direncine genel bir bakış sağladı. Çalışmanın gerçekleştirildiği mezbaaha atık sularının *E. faecium* ve *E. faecalis* ile kontamine olduğu ve izolatların linezolid ve vankomisin dışında tıbbi açıdan önemli antimikrobiyallere karşı yüksek çoklu direnç sergilediği gözlemlendi. Bulgularımız, mezbaaha atık sularının antibiyotik dirençli enterokoklar için bir rezervuar görevi görebileceğini ve bu organizmaların çevre-tarım ve dolayısı ile insanlara kolonizasyonunda etkili olabileceğini göstermektedir. Enterokoklar arıtılmamış veya yetersiz arıtılmış atık suların tarımsal sulama suyuna ya da içme sularına karışması ile kolayca gıda zincirine yayılabilir ve gıda güvenliği sorunlarına neden olabilir. Ayrıca, kontamine içme suyunun ya da gıdaların tüketilmesinin ardından potansiyel olarak insan ve hayvan sağlığı açısından uzun vadeli bir tehdit oluşturabilir. Bu nedenle, zengin mikrobiyotaya sahip MAS'ların halk sağlığı ve çevre üzerine olumsuz etkilerin en aza indirilmesi için etkin arıtma stratejileri uygulanmalarının gerektiği sonucuna varıldı. Mezbahalarda kesim sistemlerini tam otomatik hale getirecek ekipman yatırımı yapılması, personelin rumen içeriğinin ve dışkının dışarı ile temasını kesecek halka kullanımına teşvik edilmesi ve gerekli eğitimleri alması Enterokok ve diğer zoonotik patojenlerin kontaminasyon riskini azaltacaktır. Sığır mezbahaları atık sularının antibiyotik dirençli patojen enterokokların çevre yayılımındaki olası rolü hakkında bilgimiz dahilinde veri eksikliği bulunmaktadır. Dolayısıyla mezbaaha atık sularındaki ÇAD enterokok türlerinin temsil ettiği halk sağlığı tehdidinin büyüklüğünün değerlendirilmesi, besi hayvanlarında antibakteriyel ilaç kullanım sıklığının araştırılmasının yanısıra atık su izolatları ile gıda ve klinik izolatlar arasındaki ilişkiyi belirlemek için ileri moleküler çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TDK-2021-11343 proje kodu ile desteklenmiştir. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Adegoke AA, Madu CE, Reddy P, Stenström TA, Okoh AI. Prevalence of vancomycin resistant *Enterococcus* in wastewater treatment plants and their recipients for reuse using PCR and MALDI-ToF MS. *Front Environ Sci* 2022; 9: 797992.
- Adeniji OO, Sibanda T, Okoh AI. Molecular detection of antibiotic resistance and virulence gene determinants of *Enterococcus* species isolated from coastal water in the Eastern Cape Province, South Africa. *Int J Environ Stud* 2021; 78(2): 208-27.
- Alipour M, Hajiesmaili R, Talebjannat M, Yahyapour Y. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. *Sci World J* 2014; 287458.
- Carey SA, Goldstein RER, Gibbs SG, Claye E, He X, Sapkota AR. Occurrence of vancomycin-resistant and-susceptible *Enterococcus* spp. in reclaimed water used for spray irrigation. *Environ Res* 2016; 147: 350-5.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Thirty Third Edition 2023.
- Dec M, Stępień-Pyśniak D, Gnat S, Fratini F.; Urban-Chmiel R, Cerri D, Winiarczyk S, Turchi B. Antibiotic susceptibility and virulence genes in *Enterococcus* isolates from wild mammals living in Tuscany, Italy. *Microb Drug Resist* 2020; 26: 505-19.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 24-7.
- Foyle L, Burnett M, Creaser A, Hens R, Keough J, Madin L, Price R, Smith H, Stone S, Kinobe RT. Prevalence and distribution of antimicrobial resistance in effluent wastewater from animal slaughter facilities: A systematic review. *Environ Pollut* 2023; 318: 120848.
- Gagetti P, Bonofiglio L, García Gabarrot G, Kaufman S, Mollerach M, Vigliarolo L, von Specht M, Toresani I, Lopardo HA. Resistencia a los β -lactámicos en enterococos. *Rev Argent Microbiol* 2019; 51(2): 179-83.
- Gotkowska-Płachta, A. The prevalence of virulent and multidrug-resistant enterococci in river water and in treated and untreated municipal and hospital wastewater. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(2): 563.
- Güngör C, Gündoğ D.A., Onmaz NE. (2023). Mezbaaha ortamından izole edilen *Enterococcus faecalis*

- izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi ve biyofilm ile ilişkili virülans genlerin varlığı. *Bozok Vet Sci* 2023; 4(1): 12-7.
- Hancock LE, Gilmore MS. Pathogenicity of enterococci. Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, eds. In: *Gram-Positive Pathogens*. Washington DC: ASM Press, 2000; pp. 251-8.
- Hao W, Shan X, Li D, Schwarz S, Zhang SM, Li XS, Du XD. Analysis of a *poxtA*- and *optrA*-co-carrying conjugative multiresistance plasmid from *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 2019; 74: 1771-5.
- Hembach N, Bierbaum G, Schreiber C, Schwartz T. Facultative pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes in swine livestock manure and clinical wastewater: A molecular biology comparison. *Environ Poll* 2022; 313: 120128.
- Igbinosa IH, Rajé OC. Characterization of *Enterococcus* species isolated from abattoir environment in Benin City, Nigeria. *Ife J Sci* 2019; 21(3): 81-95.
- Igbinosa EO, Beshiru A, Odjajare EEO. Diversity, antimicrobial characterization and biofilm formation of enterococci isolated from aquaculture and slaughterhouse sources in Benin City, Nigeria. *Ife J Sci* 2021; 22: 51-63.
- Jannati E, Khademi F, Manouchehrifar M, Maleki D, Amirmozaffari N, Sadat Nikbin V, Arzanlou M. Antibiotic resistance and virulence potentials of *E. faecalis* and *E. faecium* in hospital wastewater: A case study in Ardabil, Iran. *J Water and Health* 2023; 21(9): 1277-90.
- Kim MH, Moon DC, Kim SJ, Mechesso AF, Song HJ, Kang HY, Choi JH, Yoon SS, Lim SK. Nationwide surveillance on antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from healthy food animals in South Korea, 2010 to 2019. *Microorganisms* 2021; 9(5): 925.
- Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. The many faces of *Enterococcus* spp. commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms* 2021; 7(9): 1900.
- Kwit R, Zając M, Śmiałowska-Węglińska A, Skarżyńska M, Bomba A, Lalak A, Skrzypiec E, Wojdat D, Koza W, Mikos-Wojewoda E. Prevalence of *Enterococcus* spp. and the whole-genome characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from free-living birds in Poland. *Pathogens* 2023; 12(6): 836.
- Maleki D, Manouchehrifar M, Kheljan MN, Mossavi SH, Jannati E, Doghaheh HP, Teimourpour R, Khademi F, Arzanlou M. Vancomycin-resistant *Enterococcus* species: antimicrobial resistance and virulence genes profile. *Gene Rep* 2021; 25: 101338.
- Mir R, Salari S, Najimi M, Rashki A. Determination of frequency, multiple antibiotic resistance index and resistotype of *Salmonella* spp. in chicken meat collected from southeast of Iran. *Vet Med Sci* 2022; 8(1): 229-36.
- Montealegre MC, Roh JH, Rae M, Davlieva MG, Singh KV, Shamoo Y, Murray BE. Differential penicillin-binding protein 5 (PBP5) levels in the *Enterococcus faecium* clades with different levels of ampicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(1): e02034-16.
- Mwikuma G, Kainga H, Kallu SA, Nakajima C, Suzuki Y, Hang'ombe BM. Determination of the prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* associated with poultry in four districts in Zambia. *Antibiotics* 2023;12(4): 657.
- Ni J, Long X, Wang M, Ma J, Sun Y, Wang W, Yu M, Yang H, Pan D, Tang B. Transmission of linezolid-resistant *Enterococcus* isolates carrying *optrA* and *poxtA* genes in slaughterhouses. *Front Sustain Food Syst* 2023; 7: 1179078.
- Olawale SI, Busayo OOM, Olatunji OI, Mariam M, Olayinka OS. Plasmid profiles and antibiotic susceptibility patterns of bacteria isolated from abattoirs wastewater within Ilorin, Kwara, Nigeria. *Iranian J Microbiol* 2020; 12(6): 547.
- Paschoalini BR, Nuñez KVM, Maffei JT, Langoni H, Guimarães FF, Gebara C, Freitas NE, Santos VG, Fidelis CD, Kappes R, Gonçalves MC, Silva NCC. The emergence of antimicrobial resistance and virulence characteristics in *Enterococcus* species isolated from bovine milk. *Antibiotics* 2023; 12(8): 1243.
- Savin M, Bierbaum G, Kreyenschmidt J, Schmithausen RM, Sib E, Schmogger S, Kasbohrer A, Hammerl JA. Clinically relevant *Escherichia coli* isolates from process waters and wastewater of poultry and pig slaughterhouses in Germany. *Microorganisms* 2021; 9(4): 698.
- Sib E, Lenz-Plet F, Barabasch V, Klanke U, Savin M, Hembach N, Bierbaum G. Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *Sci Total Environ* 2020; 746: 140894.
- Solaiman S, Patterson R, Davey K, Katz Y, Payne-Sturges D, Sapkota AR, Micallef SA. Effects of season and water type on the distribution and anti-

microbial resistance of *Enterococcus faecalis* and *Ent. faecium* from surface and reclaimed water. J Appl Microbiol 2022; 133(2): 477-87.

US Environmental Protection Agency. Method 1611.1: Enterococci in water by TaqMan quantitative polymerase chain reaction (qPCR). EPA-820-R-15-008. US, 2015.

Xuan H, Yao X, Pan R, Gao Y, Wei J, Shao D, Liu K, Li Z, Qiu Y, Ma Z, Li B, Xia L. Antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of swine origin from eighteen provinces in China. J Vet Med Sci 2021; 83(12): 1952-8.

Yoon S, Kim YB, Seo KW, Ha JS, Noh EB, Lee YJ. Characteristics of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from broiler breeder farms. Poult Sci 2020; 99: 6055-61.

Zaheer R, Cook SR, Barbieri R, Goji N, Cameron A, Petkau A, McAllister TA. Surveillance of *Enterococcus* spp. reveals distinct species and antimicrobial resistance diversity across a One-Health continuum. Sci Reports 2020; 10 (1): 3937.