



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PİLİÇ ETLERİNDE VANKOMİSİN DİRENÇLİ
ENTEROKOKLARIN VARLIĞININ VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Bahar ONARAN

**GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİLİÇ ETLERİNDE VANKOMİSİN DİRENÇLİ
ENTEROKOKLARIN VARLIĞININ VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

Bahar ONARAN

**GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI**

ANKARA

2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Piliç Etlerinde Vankomisin Dirençli Enterokokların Varlığının ve Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

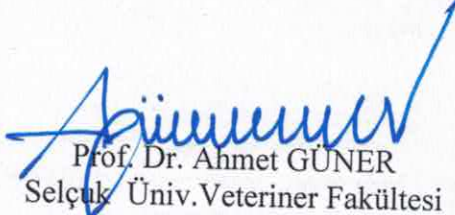
Öğrencinin Adı Soyadı: Bahar Onaran

Tarih: 08.08.2017

İmza: 

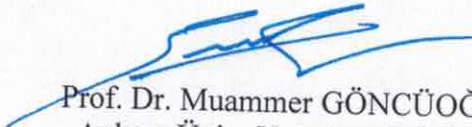
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında
Bahar ONARAN tarafından hazırlanan
'Piliç Etlerinde Vankomisin Dirençli Enterekokların Varlığının ve Antibiyotik Dirençliliğinin
Belirlenmesi' adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından
DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

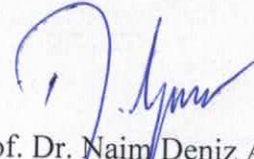
Tez Savunma Tarihi : 08.08.2017


Prof. Dr. Ahmet GÜNER
Selçuk Üniv. Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi
Üye


Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi
Üye


Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU
Ankara Üniv. Veteriner Fakültesi
Üye


Prof. Dr. Naim Deniz AYAZ
Kırıkkale Üniv. Veteriner Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Enterokokların Tarihçesi ve Klasifikasyonu	3
1.2. Enterokokların Genel Özellikleri	7
1.3. Enterokokların Epidemiyolojisi	14
1.4. Enterokokların Virulens Faktörleri	16
1.5. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç	17
1.5.1. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	17
1.5.1.1. İntrinsik (doğal) direnç	17
1.5.1.2. Kazanılmış direnç	18
1.5.1.3. Plazmid ve transpozonlar	19
1.5.1.4. Horizontal gen transferi	21
1.5.2. Enterokokların Direnç Geliştirdikleri Antibiyotikler	22
1.5.2.1. Aminoglikozitlere direnç	22
1.5.2.2. Beta laktamlara karşı direnç	25
1.5.2.2.1. Penisilin direnci	26
1.5.2.2.2. Ampisilin direnci	27
1.5.2.3. Glikopeptidlere direnç	28
1.5.2.3.1. Vankomisin direnci	30
1.5.2.3.1.1. Vankomisinin genotipik sınıflandırması ve direnç mekanizmaları	33
1.5.2.3.1.1.1. Peptidoglikan sentezinde vankomisinin rolü	33
1.5.2.3.1.1.2. <i>vanA</i> glikopeptid direnci	34
1.5.2.3.1.1.3. <i>vanB</i> glikopeptid direnci	34
1.5.2.3.1.1.4. <i>vanC</i> glikopeptid direnci	35
1.5.2.3.1.1.5. <i>vanD</i> glikopeptid direnci	36
1.5.2.3.1.1.6. <i>vanE</i> glikopeptid direnci	36
1.5.2.4. Kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolononlar	37
1.5.2.5. Daptomisin direnci	38
1.5.2.6. MLS antibiyotikleri (makrolidler, linkozamidler ve streptogramin)	40
1.5.2.7. Oksasolidinonlar ve everninomisinler	41
1.6. Gıdalarda antibiyotiklere dirençli enterokoklar	43
1.6.1. Süt ürünlerinde antibiyotiklere dirençli enterokoklar	45
1.6.2. Et ürünlerinde antibiyotiklere dirençli enterokoklar	46
1.7. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar	49
1.8. Enterokokal enfeksiyonların sağaltımı	49
1.9. Yasal düzenlemeler	50

2. GEREÇ VE YÖNTEM	52
2.1. Gereç	52
2.1.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri	52
2.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su	52
2.1.1.2. Slanetz-Bartley Agar	52
2.1.1.3. % 0.6 Maya Ekstraktı İçeren Tryptone Soya Agar	53
2.1.1.4. Brain Heart Infusion Broth	54
2.1.2. <i>Enterococcus</i> spp. İdentifikasyonu Amacıyla Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri	54
2.1.2.1. Hidrojen Peroksit	54
2.1.2.2. pH'sı 9.6 olan ve % 6.5'lik NaCl içeren MRS Agar	55
2.1.2.3. Sulphide Indole Motility Medium	55
2.1.2.4. Bile Esculin Agar	56
2.1.2.5. Moeller Decarboxylase Broth Base	56
2.1.2.6. Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri ve Şekerler	57
2.1.3. <i>Enterococcus</i> spp. İzolatlarının PCR Analizi Amacıyla Kullanılan Kimyasallar	58
2.1.3.1. <i>Taq</i> DNA Polymerase Set	58
2.1.3.2. dNTP Set	58
2.1.3.3. DNA Ladder ve Yükleme Solüsyonu	58
2.1.3.4. Primerler	59
2.1.3.5. TBE Solüsyonu	59
2.1.3.6. Ethidium Bromide	59
2.1.3.7. Agaroz Jel	59
2.1.4. <i>Enterococcus</i> spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskler	60
2.1.4.1. Mueller-Hinton Agar	60
2.1.4.2. Antibiyotik Diskleri	61
2.2. Yöntem	61
2.2.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu	61
2.2.2. Biyokimyasal Reaksiyonlar	62
2.2.2.1. Katalaz Reaksiyonu	62
2.2.2.2. Motilite reaksiyonu	63
2.2.2.3. L- pirolidonil- β -naftilamid (PYR) Reaksiyonu	64
2.2.2.4. Eskülin Reaksiyonu	64
2.2.2.5. Arjinin Dekarboksilasyon Reaksiyonu	65
2.2.2.6. Pigmentasyon Reaksiyonu	66
2.2.2.7. Karbonhidrat Fermentasyon Reaksiyonları	66
2.2.3. PCR Analizi ile <i>Enterococcus</i> spp. Doğrulanması	68
2.2.4. Multipleks PCR ile <i>Enterococcus</i> spp. İdentifikasyonu	69
2.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi	71
2.2.6. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> İzolatlarında Multipleks PCR İle <i>van A</i> ve <i>van B</i> Genlerinin Tespiti	72
2.2.7. E-Test Yöntemi ile Vankomisin İzolatlarına Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi	73
3. BULGULAR	74
3.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu	74

3.2. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> izolatlarında multiplex PCR yöntemi ile <i>vanA</i> ve <i>vanB</i> genlerinin belirlenmesi	80
3.3. Antibiyotik direnç profillerinin saptanması için disk difüzyon yöntemi	80
3.4. E-Test Yöntemi ile Vankomisin İzolatlarına Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi	86
4. TARTIŞMA	90
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
ÖZET	103
SUMMARY	104
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	118



ÖNSÖZ

Günümüzde antibiyotik direnci halk sağlığını tehdit eden problemlerin başında gelmektedir. Antibiyotik direnç tablosuna *Enterococcus* spp. çerçevesinden bakıldığında ise, Vankomisin Dirençli Enterokoklar (VRE) tarafından oluşturulan infeksiyonların halk sağlığını önemli ölçüde tehdit ettiği görülmektedir.

Dünya çapında nozokomiyal ve gıda kaynaklı infeksiyonlar açısından önem arz eden bu mikroorganizmanın Türkiye’de tavuk etleri gibi riskli gıdalardaki durumunun belirlenmesi, gıda güvenliği ve halk sağlığı boyutu ile ilgili bilimsel bir veri sağlanması açısından önem arz etmektedir. Elde edilen veriler tavuk etlerinde vankomisine dirençli enterokokların varlığının belirlenmesi ile potansiyel risklerin belirlenmesine hizmet edecektir.

Türkiye’de yapılan çalışmalar dikkate alındığında, daha çok nozokomiyal infeksiyon yönünden önem taşıyan vankomisin dirençli enterokokların tavuk etlerinde varlığı ile ilgili yeterli çalışma bulunmaması gıda güvenliği ve halk sağlığı yönünden önemli eksiklik olarak dikkat çekmektedir. Kesim prosedürüne bağlı olarak tavuk etleri sıklıkla *Enterococcus* türleri ile kontamine olmakta ve halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır.

Bu çalışma kapsamında tavuk eti örneklerinde *Enterococcus* spp. varlığının saptanması, PCR analizi ile *Enterococcus* spp.’nin doğrulanması ve multipleks PCR analizi yapılarak moleküler karakterizasyonları, antibiyotik direnç profillerinin araştırılması, *E. faecalis*, *E. faecium*’da *van A* ve *van B* vankomisin direnç genlerinin PCR ile belirlenmesi ile vankomisin direnci saptanan izolatlarda söz konusu antibiyotiğin E-test yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma süresince hem bilimsel hem manevi anlamda yanımda olan danışmanım Prof. Dr. F. Seda Bilir Ormancı'ya, çalışmaya ve bilimsel gelişimime önemli katkılarından dolayı Prof. Dr. Muammer Göncüoğlu'na, her zaman elindeki tüm imkanları bana sunan değerli hocam Prof. Dr. Naim Deniz Ayaz'a, doktora eğitimim boyunca her zaman, her anlamda desteklerini hissettiğim aileme teşekkür ederim.

Çalışma, TÜBİTAK tarafından “113Z407” proje numarası ile “Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı” kapsamında desteklenen proje verilerinin bir kısmını içermektedir.



Simgeler ve Kısaltmalar

ABA	Aesculin-Bile-Azide Medium
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AF	Agregation Factor (Agregasyon Faktörü)
APE	Antimicrobial Performance Enhancers (Antimikrobiyal Performans Arttırıcılar)
ATP	Adenozin Trifosfat
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CATC	Citrate Azide Tween Carbonate Agar
C	Kloramfenikol
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
CN	Gentamisin
CO ₂	Karbon Dioksit
D-Ala	D-Alanin
D-Lac	D-Laktat
D-Ser	D-Serin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E	Eritromisin
EBS	Enterococcal Binding Factor (Enterokokal Bağlanma Faktörü)
EfaA	<i>Enterococcus faecalis</i> Antijen A
ESP	Enterococcal Surface Protein (Enterokokal Yüzey Proteini)

FDA	United States Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
GelE	Gelatinase (Jelatinaz)
GRE	Glicopeptide Resistant Enterococci (Glikopeptidlere Dirençli Enterokoklar)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HYL	Hyaluronidase (Hyaluronidaz)
I	Intermediate Resistance (Orta Derece Direnç)
KA	Crystal Violet Azide Agar (Kristal Viyole Azid Agar)
KAA	Kanamycin Aesculin Azide Agar (Kanamisin Eskülin Azid Agar)
LTA	Lipoteikoik Asit
LZD	Linezolid
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MLS _B	Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin
MRS Agar	De Mann Rogosa Sharpe Agar
MS	Mass Spectrometry (Kütle Spektrofotometresi)
MSCRAMM	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule Adhesin of Collagen From Enterococci (Enterokokların Kollagenin Adheziv Matriks Molekül Adezyonunu Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşeni)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
P	Penisilin
PBP-5	Penisilin Bağlayıcı Protein -5
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Pulsed-Field Jel Elektroforez)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)

PYR	L- pirolidonil- β -naftilamid
RAPD-PCR	Randomly Amplified Polimorphic DNA - Polymerase Chain Reaction (Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
QD	Quinupristin/Dalfopristine (Kinupristin/Dalfopristin)
R	Resistant (Dirençli)
S	Sensitive (Duyarlı)
S	Streptomisin
SB	Slanetz and Bartley Medium
SCS	Streptococcus Selective Agar
SIM	Citrate Indole Motility
TITG	Thallous Acetate Tetrazolium Glucose Agar (Talloz Asetat Tetrazolyum Glikoz Agar)
TSA	Tryptone Soya Agar
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chloride
VA	Vankomisin
VRE	Vankomisin Resistant Enterococci (Vankomisin Dirençli Enterokoklar)
VSE	Vankomisin Sensitive Enterococci (Vankomisin Duyarlı Enterokoklar)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Gram pozitif bakterilerin 16S rRNA dendrogramıyla ortaya konmasıyla elde edilen filogenetik pozisyonu	4
Şekil 1.2. Enterokokları diğer Gram pozitif, katalaz negatif koklardan ayırmak için gerekli reaksiyonlar	9
Şekil 2.1. Slanetz_Bartley Agar'da inkübasyon sonu oluşan tipik koloniler	62
Şekil 2.2. Katalaz testinde hava kabarcıklarının oluşumu	63
Şekil 2.3. MRS Agar'da üreyen şüpheli koloniler	63
Şekil 2.4. SIM Medium'da hareket pozitif ve hareket negatif şüpheli enterokok kolonileri	63
Şekil 2.5. L- pirolidonil- β -naftilamid reaksiyonunda kırmızımtırak renk veren pozitif suşlar	64
Şekil 2.6. Bile Eskülin Agar'da siyah renk oluşturan pozitif suşlar	65
Şekil 2.7. Moeller Decarboxylase Broth Base'de pozitif ve negatif suşlar	66
Şekil 2.8. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası Phenol Red Broth Base'de karbonhidrat fermentasyonu bakımından pozitif ve negatif suşlar	68
Şekil 3.1. PCR ile <i>tuf</i> geni tespit edilen <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü	76
Şekil 3.2. Multipleks PCR ile <i>ddl_{E. faecalis}</i> ve <i>ddl_{E. faecium}</i> genleri tespit edilen <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü	77
Şekil 3.3. Multiplex PCR ile <i>ddl_{E. durans}</i> geni tespit edilen ve <i>ddl_{E. hirae}</i> geni belirlenemeyen <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü	77

Şekil 3.4. Multipleks PCR ile <i>vanA</i> ve <i>vanB</i> genleri tespit edilen <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü	80
Şekil 3.5. İzolatlara ait disk difüzyon yöntemi	81
Şekil 3.6. Disk difüzyon yöntemi ile izolatlarda belirlenen vankomisin (VA-30) direnci	86
Şekil 3.7. İzolatlara ait E test (MİK: 4 µg/ml)	86
Şekil 3.8. İzolatlara ait E test (MİK: 256 µg/ml üzeri)	86



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Enterokok türlerinin identifikasyonundaki yıllara göre değişimler	6
Çizelge 1.2. <i>Enterococcus</i> spp. özellikleri	12
Çizelge 1.3. Enterokokların aminoglikozitlere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları	25
Çizelge 1.4. Enterokokların β -laktam antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları	28
Çizelge 1.5. Enterokokların glikopeptid antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları	37
Çizelge 1.6. Enterokokların kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolonon antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları	38
Çizelge 1.7. Enterokokların MLS antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç mekanizmaları	41
Çizelge 1.8. Enterokokların oksazolidinon ve everninomisin antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları	42
Çizelge 1.9. Çeşitli gıdalardan izole edilen antibiyotik dirençli enterokoklar	49
Çizelge 2.1. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan antibiyotik diskler	61
Çizelge 2.2. <i>Enterococcus</i> spp. özellikleri	67
Çizelge 2.3. PCR analizlerinde kullanılan oligonükleotid primer çiftleri	71
Çizelge 2.4. Multipleks PCR’da kullanılan <i>vanA</i> ve <i>vanB</i> oligonükleotid primer çiftleri	73

Çizelge 3.1. Satış noktalarına göre tavuk kuşbaşı örneklerinde <i>Enterococcus</i> spp. izolat sayıları	75
Çizelge 3.2. Örneklerin alındığı tarihlere göre <i>Enterococcus</i> spp. izolasyonu ve antibiyotik direnç profilleri	79
Çizelge 3.3. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	81
Çizelge 3.4. İzolatların tür bazında antibiyotiklere direnç profilleri	84
Çizelge 3.5. CLSI standartlarına göre belirlenen MİK değerlerine göre dirençli ve duyarlı olan VRE izolatlarının sayısı	87



1. GİRİŞ

Mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı direnç gelişimi dünya çapında ilgi uyandıran önemli bir konudur. Patojen mikroorganizmalarda oluşan antibiyotik direncinin, insan ve hayvanların infeksiyonlarında başlıca profilaktik veya tedavi amaçlı antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmasından kaynaklandığı bildirilmektedir. Bu durum dirençli mikroorganizmaların ve direnç genlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Antibiyotikler, infeksiyon tedavisinin yanı sıra hayvanlarda büyütme faktörü veya performans arttırıcı (Antimicrobial Performance Enhancers, APE) olarak yemlere katılabilmektedir. APE, karbadoks ve olakindoks dışında gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olmaktadır (Andersson ve Hughes, 2011 ve Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000). Avilamisin, basitrasın, tilosin, spiramisin, virginamisin gibi büyütme faktörlerinin içinde Vankomisin Dirençli Enterokoklar (Vancomycin Resistant Enterococci, VRE) oluşumuna neden olan avoparsin, Avrupa ülkelerinde 1970’li yılların ortalarına kadar büyüme faktörü olarak kullanılmıştır (Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010; Robredo ve ark., 200 ve Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000).

Dünya genelinde yürütülen araştırmalarda, insanlarda nozokomiyal infeksiyonlara yol açan VRE için tavuk etinin önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu bilinmektedir (Philips ve ark., 2004). İnsan hekimliğinde antibiyotiklere çoklu direnç gösteren Gram pozitif mikroorganizmaların yol açtığı infeksiyonların sağaltımında kullanılan vankomisin ve hayvanlarda antibiyotik büyüme faktörü olarak kullanılan avoparsin aynı grupta yer alan antibiyotiklerdir. Bu sebeple avoparsin eklenmiş rasyonlarla beslenen hayvanlarda ve bu hayvanlardan elde edilen hayvansal gıdalarda VRE saptanabilmektedir. Avrupa Birliği ülkelerinde 2006 yılı itibariyle antibiyotik büyüme faktörleri tümüyle yasaklanmıştır. Türkiye’de ise 2002/66 numaralı tebliğde belirtildiği üzere antibiyotik büyüme faktörlerinin tamamının kullanımı 2006 tarihi sonrasında yasaklanmıştır (Aarestrup, 1995; Anon, 2002). Avrupa Birliği 1998 yılında 2821/98 sayılı karar itibariyle ‘Tilosin fosfat, avoparsin, virginamisin, spiramisin ve zinc basitrasın’ın yem katkı maddesi olarak

kullanılmasını yasaklamıştır. Ülkeler bazında ise Danimarka, Finlandiya, İsveç, ülkelerde bu antibiyotiklerin yem katkısı ve büyüme faktörü olarak kullanılması yasaklanmıştır (Anon, 1998).

İnsanların ve hayvanların gastrointestinal sisteminde; çevresel koşullara dirençli oldukları için bitkilerde, su ve toprakta bulunabilen *Enterococcus* infeksiyonlarına neden olanların çoğunluğunu *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri oluşturmaktadır. Enterokoklar bakteriyemi, intra-abdominal ve pelvik infeksiyonlar, üriner sistem, sentral sinir sistemi ve deri infeksiyonlarına yol açan etkenler patojenler olarak halk sağlığı açısından önem taşımaktadırlar (Petsaris ve ark., 2005 ve Vankerckhoven ve ark., 2008).

Tavuk eti, patojen mikroorganizmaların rahatlıkla üreyebileceği ve gelişimlerini sürdürebilecekleri oldukça uygun bir ortamdır. Gıdadan kaynaklanan infeksiyonların yanı sıra tavuk etlerinin bozulması açısından da oldukça önemlidir. Enterokoklar tuz, pH ve sıcaklığa karşı dirençleri dolayısıyla işlem görmüş gıdalarda bozulmalara sebep olmaktadır. Yeterli ısı işlemine tabi tutulmadıklarında *Enterococcus* spp. ile kontamine hayvansal gıdalar insanların gastrointestinal kanalında infeksiyonlara neden olmaktadır (Kročko ve ark., 2007).

Enterokokların sıcaklık işlemine karşı olan dirençlilik durumları; bakteri kültürünün yapısı, ortamın besin içeriği, yağ asidi miktarı, pH'sı ve membran yapısı gibi birçok etkene bağlıdır. Mikroorganizmaların gelişimini sürdürebildikleri ve üreyebildikleri en düşük sıcaklıklarda membran yapısı sabittir. Yüksek sıcaklık derecelerinde ise doymuş yağ asidi miktarının düşmesi ve membran yağ asidi konsantrasyonunun artması, enterokokları yüksek sıcaklığa minimum dirençli duruma getirmektedir (Ahmad ve ark., 2002 ve Ivanov ve ark., 1999).

Enterokokların sıcaklığa karşı olan dirençleri mikroorganizmaların büyüme eğrisindeki durgunluk fazı, lag fazı ve latent fazlarında artış göstermektedir. Sıklıkla uygun olmayan çevre koşullarına maruz kaldıklarından dolayı da enterokoklar, yaşam sürelerinin uzun bir kısmını ortamda büyüme için gerekli olabilecek ham

madde ve besinsel içeriklerin tükendiği durgunluk fazında geçirmektedirler ve dolayısıyla yaşam döngülerinin uzun bir bölümünde sıcaklığa karşı olan dirençleri yüksektir (Ahmad ve ark., 2002 ve Martinez ve ark., 2003). Bunun yanı sıra enterokoklar donmuş muhafazaya ve dondurma işlemlerine karşı göreceli olarak dirençli oldukları için donmuş ürünlerde fekal indikatör olarak değerlendirilmektedirler. *Enterococcus* spp. çiğ ette 10^2 - 10^4 kob/g; insan dışkısında ise *E. faecium* ise 10^4 - 10^5 kob/g, *E. faecalis* 10^5 - 10^7 kob/g kadar bulunmaktadır (Erol, 2007 ve Kročko ve ark., 2007).

1.1. Enterokokların Tarihçesi ve Klasifikasyonu

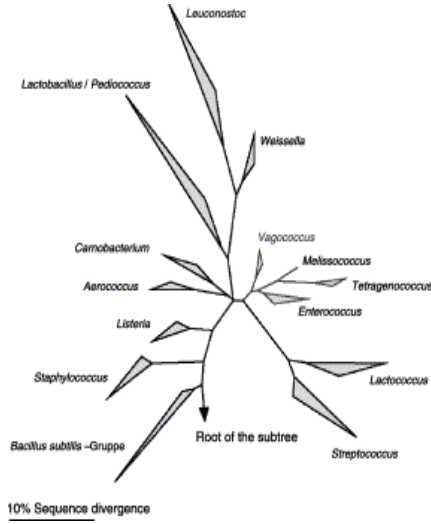
Enterococcus kelime anlamı olarak Yunanca'da bağırsak anlamına gelen 'entero' ve granül anlamına gelen 'coccus' kelimelerinden oluşmaktadır (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984).

Enterokokların klasifikasyonu zaman içinde değişime uğramıştır. Bu değişim moleküler tekniklerin gelişmesine paralel olarak gerçekleşmiş, 16S rRNA ve DNA-DNA ve DNA-rRNA hibritleşmeleri sayesinde daha ayrıntılı bir klasifikasyon yapılmasının ardından *Enterococcus* cinsi ortaya çıkmıştır (Hartman ve ark., 1992 ve Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984).

Enterokokların tanımlanması ilk kez 1899 yılında Thiercelin tarafından yapılmış, daha sonra 1903 yılında Thiercelin ve Jouhaud tarafından '*Enterococcus*' olarak adlandırılmıştır. *Streptococcus faecalis* 1906 yılında Andrewes ve Horder tarafından patojen bir mikroorganizma olarak endokarditli bir hastadan izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Klein, 2003).

Bir başka girişim de 1933 yılında streptokokların serogruplarını tanımlayan Lancefield tarafından gerçekleştirilmiştir. Lancefield serolojik sınıflandırmasına göre grup D antijeni taşıyan fekal orijinli tüm streptokoklar enterokok olarak değerlendirilmiştir (Hartman ve ark., 1992).

Streptokokları dört grup altında toplayan ise 1937 yılında Sherman olmuştur, Sherman'ın yaptığı sınıflandırmaya göre streptokoklar; fekal streptokoklar (enterokoklar), laktik streptokoklar, viridans ve pyogen streptokoklar olmak üzere dört grup altında toplanmıştır. Jones, 1978 yılında viridans ve enterokok gruplarını fekal streptokok olarak birleştirmiştir. Schleifer ve Kilpper-Bälz 1984 yılında sınıflandırmayı *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Lactococcus* olarak değiştirmiştir. Bu gruplar arasındaki farklar 16S rRNA sekans karşılaştırmalarıyla ortaya konmuş ve *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Lactococcus* farklı gruplara ayrılmıştır (Şekil 1.1) (Klein, 2003).



Şekil 1.1. Gram pozitif bakterilerin 16S rRNA dendrogramıyla ortaya konmasıyla elde edilen filogenetik pozisyonu (Ludwig ve ark., 1985; Klein, 2003).

Enterococcus cinsi içerisinde tür ayrımı ilk olarak 1984 yılında Schleifer ve Kilpper-Bälz (1984) tarafından yapılmış, önceden *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* olarak isimlendirilen türler *E. faecium* ve *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır (Hartman ve ark., 1992; Klein, 2003).

Daha sonra *E. faecium* ve *E. faecalis*'un yanı sıra *Enterococcus* cinsine ait birçok farklı tür de tanımlanmıştır. Euzeby tarafından 1997 yılında 26 enterokok türünün varlığı yayınlanmış olup, daha sonradan tanımlanan türler fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre farklılıklar içermiştir (Klein, 2003).

Enterokok türlerini farklı tür grupları altında toplamak için 16S rRNA sekans verileri kullanılmıştır. Enterokok türleri *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. saccharolyticus* türleri grupları olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre;

1. ***E. faecalis* türleri grubunda;** *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*,
2. ***E. faecium* türleri grubunda;** *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. porcinus*, *E. villorum*,
3. ***E. avium* türleri grubunda;** *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*,
4. ***E. casseliflavus* türleri grubunda;** *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens*,
5. ***E. cecorum* türleri grubunda;** *E. cecorum*, *E. columbae*,
6. ***E. dispar* türleri grubunda;** *E. dispar*, *E. asini*,
7. ***E. saccharolyticus* türleri grubunda;** *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*

yer almaktadır (Klein, 2003).

Enterokokların klasifikasyonunda yapılan değişikliklerle birlikte günümüze kadar 55 enterokok türü ve iki enterokok alttürü identifiye edilmiş, tarih sırasına göre identifiye edilen türler Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (Anon, 2017a).

Çizelge 1.1. Enterokok türlerinin identifikasyonundaki yıllara göre değişimler (Anon, 2017a)

Tür	Yıl	Kaynak
<i>E. faecium</i>	1984	Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984
<i>E. avium</i>	1984	Collins ve ark., 1984
<i>E. casseliflavus</i>	1984	Collins ve ark., 1984
<i>E. gallinarum</i>	1984	Collins ve ark., 1984
<i>E. durans</i>	1984	Collins ve ark., 1984
<i>E. malodoratus</i>	1984	Collins ve ark., 1984
<i>E. hirae</i>	1984	Farrow ve Collins, 1985
<i>E. mundtii</i>	1986	Collins ve ark., 1986
<i>E. pseudoavium</i>	1989	Collins ve ark., 1989
<i>E. raffinosus</i>	1989	Collins ve ark., 1989
<i>E. solitarius</i>	1989	Collins ve ark., 1989
<i>E. cecorum</i>	1989	Williams ve ark., 1989
<i>E. faecalis</i>	1991	Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984
<i>E. saccharolyticus</i>	1991	Rodrigues ve Collins, 1990
<i>E. dispar</i>	1991	Collins ve ark., 1991
<i>E. seriolicida</i>	1991	Kusuda ve ark., 1991
<i>E. sulfureus</i>	1991	Martinez-Murcia ve Collins, 1991
<i>E. flavescens</i>	1992	Pompei ve ark., 1992
<i>E. columbae</i>	1993	Devriese ve ark., 1990
<i>E. asini</i>	1998	De Vaux, 1998
<i>E. moraviensis</i>	2001	Svec ve ark., 2001
<i>E. haemoperoxidus</i>	2001	Svec ve ark., 2001
<i>E. gilvus</i>	2002	Tyrrell ve ark., 2002
<i>E. canis</i>	2003	De Graef ve ark., 2003
<i>E. hermanniensis</i>	2004	Koort ve ark., 2004
<i>E. porcinus</i>	2001	Teixeira ve ark., 2001
<i>E. ratti</i>	2001	Teixeira ve ark., 2001
<i>E. villorum</i>	2001	Vancanneyt ve ark., 2001
<i>E. pallens</i>	2002	Tyrrell ve ark., 2002
<i>E. phoeniculicola</i>	2003	Law-Brown ve Meyers, 2003
<i>E. saccharominimus</i>	2004	Vancanneyt ve ark., 2004
<i>E. italicus</i>	2004	Fortina ve ark., 2004
<i>E. canintestini</i>	2005	Naser ve ark., 2005
<i>E. aquimarinus</i>	2005	Svec ve ark., 2005
<i>E. devriesei</i>	2005	Svec ve ark., 2005
<i>E. caccae</i>	2006	Carvalho ve ark., 2006
<i>E. silesiacus</i>	2006	Svec ve ark., 2006
<i>E. termitis</i>	2006	Svec ve ark., 2006

Çizelge 1.1 (devam). Enterokok türlerinin identifikasyonundaki yıllara göre değişimler (Anon, 2017a)

Tür	Yıl	Kaynak
<i>E. camelliae</i>	2007	Sukontasing ve ark., 2007
<i>E. thailandicus</i>	2008	Tanasupawat ve ark., 2008
<i>E. viikkiensis</i>	2011	Rahkila ve ark., 2011
<i>E. lactis</i>	2012	Morandi ve ark., 2012
<i>E. rivorum</i>	2012	Niemi ve ark., 2012
<i>E. quebecensis</i>	2012	Sistek ve ark., 2012
<i>E. ureasiticus</i>	2012	Sistek ve ark., 2012
<i>E. plantarum</i>	2012	Svec ve ark., 2012
<i>E. saccharolyticus subsp. saccharolyticus</i>	2013	Chen ve ark., 2013
<i>E. saccharolyticus subsp. taiwanensis</i>	2013	Chen ve ark., 2013
<i>E. evrekensis</i>	2013	Cotta ve ark., 2013
<i>E. lemanii</i>	2013	Cotta ve ark., 2013
<i>E. alcedinis</i>	2013	Frolkova ve ark., 2013
<i>E. diestrammenae</i>	2013	Kim ve ark., 2013
<i>E. rotai</i>	2013	Sedlacek ve ark., 2013
<i>E. ureilyticus</i>	2013	Sedlacek ve ark., 2013
<i>E. xiangfangensis</i>	2014	Li ve ark., 2014
<i>E. olivae</i>	2014	Lucena-Padros ve ark., 2014
<i>E. bulliens</i>	2016	Kadri ve ark., 2015

1.2. Enterokokların Genel Özellikleri

Enterokoklar genel olarak sıcakkanlı ve soğukkanlı hayvanların intestinal kanalında, mukozal yüzeylerinde bulunmakta, aynı zamanda toprak, su, et ve süt ürünleri, çeşitli gıdalar ve bitkilerden de izole edilebilmektedirler. Bazı türlerin konak spesifik olma yatkınlıkları bulunmakla birlikte genellikle enterokoklar mutlak konak spesifik özellikte değildir (Abouelnaga ve ark., 2016; Gomes ve ark., 2008 ve Hartman ve ark., 1992).

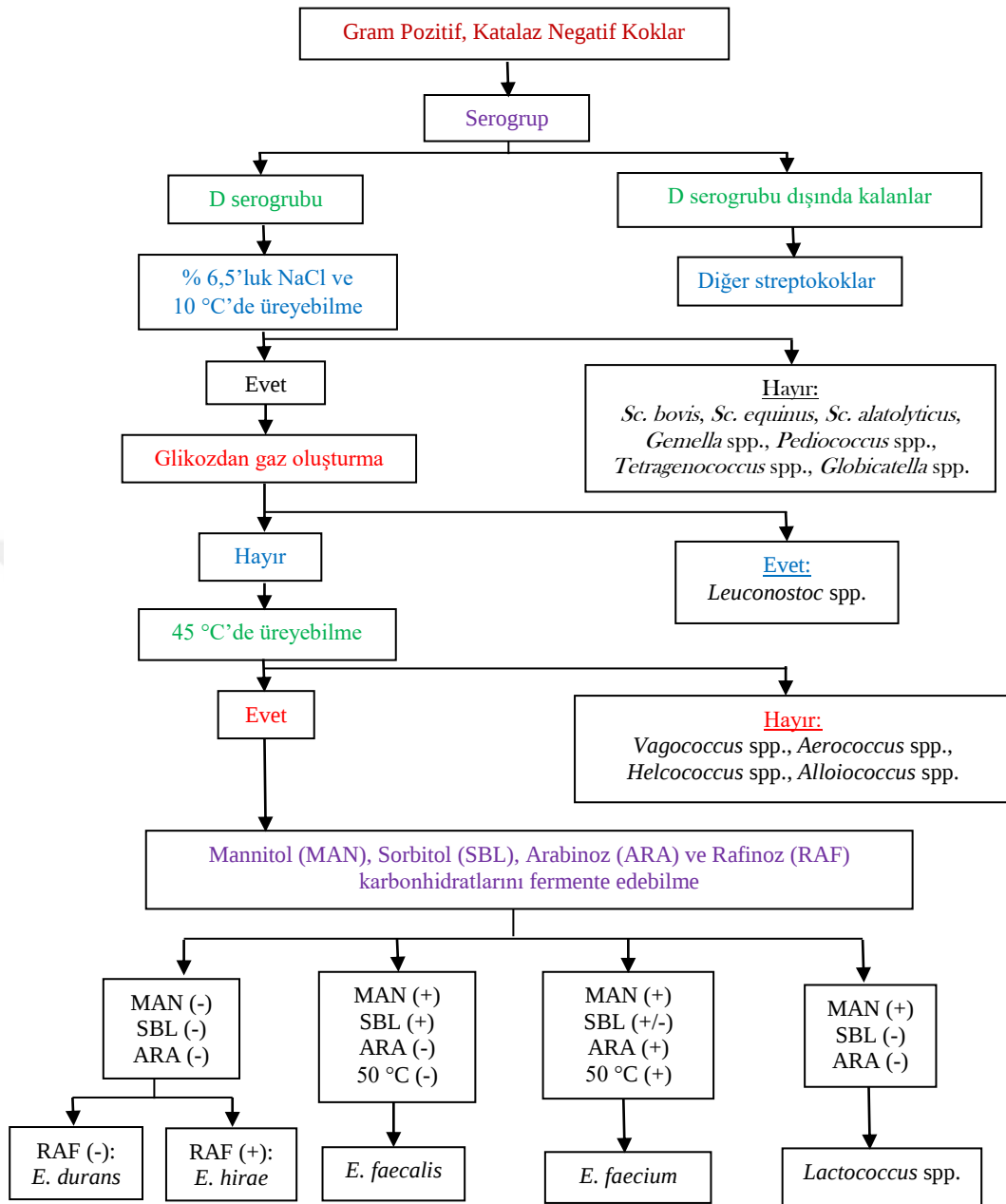
Enterococcus cinsine ait türler genellikle tek, çift ya da küçük gruplar halinde bulunan, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, katalaz negatif Gram-pozitif kokları içermektedir. Glikoz fermentasyonu sonucunda son ürün olarak en fazla miktarda L(+) laktik asit oluşur; % 6,5 NaCl içeren ortamda ve pH 4,6-9,6 aralığında

(optimum 7,5) üreyebilme, safra tuzları varlığında (max. % 40) eskülini hidrolize etme enterokok izolatlarını tanımlama için karakteristik özelliklerdir. Yine, enterokoklar leucine- β -naphthylamide (LAP) ve l-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) hidrolizi gerçekleştirmektedirler (Abouelnaga ve ark., 2016; Fisher ve Philips, 2009 ve Teixeira ve Merquior, 2013).

Enterokoklar genellikle 5-50 °C sıcaklıklarında üreyebilmektedirler. Gelişebildikleri optimum, minimum ve maksimum sıcaklık dereceleri sırasıyla 42,7 , 6,5 ve 47,8 °C olarak belirtilmektedir (Van den Berghe ve ark., 2006). Ayrıca, *E. faecalis* ve *E. faecium* sıcaklığa relatif dirençli türlerdir. Bu özellikleriyle yapısal benzerlik gösterdikleri streptokoklardan ayrılmaktadırlar. Enterokok türlerinin çoğu donma işlemine karşı da relatif direnç göstermektedir (Abouelnaga ve ark., 2016; Hartman ve ark., 1992 ve Moreno ve ark., 2006).

Az sayıda streptokok (*Sc. avium*, *Sc. bovis*, *Sc. faecalis*, *Sc. faecium*, *Sc. liquefaciens*, *Sc. casseliflavus*, *Sc. alactolyticus*, *Sc. durans*, *Sc. Zymogenes* ve *Sc. equinus*) Lancefield sınıflandırmasına göre D serogrubunda yer almaktadır. D serogrubunda yer alan enterokokları streptokoklardan ayıran en önemli özellikleri % 6,5 NaCl konsantrasyonunda ve 10 °C’de üreyebilmeleridir (Hartman ve ark., 1992 ve Klein, 2003).

Enterokokları diğer Gram pozitif, katalaz negatif koklardan (*Pediococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus* türlerinden) ayırmak için ise Şekil 1.2’deki reaksiyonlar esas alınmaktadır (Facklam ve Elliott, 1995 ve Klein, 2003).



Şekil 1.2. Enterokokları diğer Gram pozitif, katalaz negatif koklardan ayırmak için gerekli reaksiyonlar (Facklam ve Elliott, 1995 ve Klein, 2003).

Diğer fenotipik identifikasyon sistemleri de farklı araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir (Devriese ve ark., 1993; Facklam ve Collins, 1989 ve Teixeira ve ark., 1995). Bu sistemler enzim aktivitelerinin yanı sıra fermentasyon modelleri ve/veya fizyolojik özellikleri esas alınarak geliştirilmiştir. Fenotipik ve fiziksel özelliklerde esas alınan özellikler, belirlenen sıcaklık derecelerinde üreme ve karbonhidrat fermentasyon modelleridir. Ayrıca, *E. faecium* ve *E. faecalis* için selektif besiyerlerinde üreme karakteristikleri de önem arz etmektedir. Örneğin,

E. faecalis'in triphenyl-tetrazolium-chloride (TTC) üzerinde güçlü bir indirgeme etkisi bulunurken, *E. faecium* bu etkiyi ya oldukça düşük derecede göstermekte ya da göstermemektedir. TTC içeren selektif besiyerinde *E. faecalis* koyu kırmızı, *E. faecium* ise soluk pembe koloniler halinde görülmektedir (Klein, 2003).

Et ve süt ürünlerinden, aynı zamanda hayvan ve insan dışkısından alınan numuneler için kullanılan farklı besiyerleri mevcuttur. Bu amaçla sıklıkla kullanılan besiyerleri; Aesculin-bile-azide medium (ABA), Kanamycin aesculin azide agar (KAA), Citrate azide tween carbonate agar (CATC), Slanetz and Bartley medium (SB), Thallous acetate tetrazolium glucose agar (TITG), Streptococcus selective agar (SCS) ve Crystal violet azide agar (KA)'dır. CATC ve ABA besiyerleri vankomisin eklenerek kullanıldığında VRE identifikasyonu için kullanılmaktadır (Klein ve ark., 1998; Klein, 2003).

Özellikle heterojen mikrofloraya sahip kaynaklardan elde edilen numunelerin güvenilir ve hızlı identifikasyonu için moleküler yöntemler esastır. Özellikle 16S ve 23S rRNA hedefleyen propların *Enterococcus* spp. identifikasyonda başarılı olduğu kanıtlanmıştır (Devriese ve ark., 1993). Enterokok türlerinin tiplendirilmesi amacıyla; Kütle Spektrofotometresi (Mass Spectrometry, MS), Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Randomly Amplified Polimorphic DNA-Polymerase Chain Reaction, RAPD-PCR), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Pulsed-Field Jel Elektroforez, PFGE), Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (Kontürü Kenetlenmiş Homojen Elektrik Alan Elektroforezi, CHEF) ve sınırlayıcı enzim analizleri kullanılabilmektedir (Klein, 2003).

Enterokokal türlerin tanımlama kriterleri fenotipik testler ve DNA-DNA yeniden birleşme analizleri, 16S rRNA gen sekanslamaları ve tüm hücre protein profillerinin analiz edilmesi gibi farklı moleküler tekniklerin kombinasyonları esas alınarak oluşturulmuştur. 16S rDNA'nın kısmi ya da tüm sekansı, enterokok türlerinin identifikasyonu için en pratik ve etkin yöntemdir (Anon, 2017b ve Teixeira ve Merquior, 2013).

Rutin tanı laboratuvarlarında kullanılan otomatik, yarı otomatik ve manüel olarak çalışılan birçok identifikasyon yöntemi ile enterokok türleri identifiye edilmektedir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında ise enterokok türlerinin hızlı identifikasyonu için moleküler teknikler kullanılmaktadır. Enterokokların klinik izolatlardan identifiye edilmesinde birçok moleküler teknik geliştirilmiş ve gelecekte daha hızlı ve kesin tanı yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır (Jackson ve ark., 2004 ve Teixeira ve Merquior, 2013). Enterokok türlerinin ayırımında kullanılan biyokimyasal testler Çizelge 1.2’de verilmiştir.



Çizelge 1.2. *Enterococcus* spp. özellikleri (Hartman ve ark., 1992;Manero ve Blanch, 1999).

Mikroorganizma	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. mundii</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. solitarius</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. sulfurous</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. flavescens</i>
Mannitol	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F	-	+	-	+	+
Sukroz	+	F	+	+	+	+	-	+	+	F	+	+	+	+	ND	+	+	+
Riboz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	-
Sorboz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	-	-	-	-	ND	-	-
Raffinoz	F	-	-	F	+	F	-	+	(+)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	F	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Eskülin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Motilite	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	+
α - galaktosidaz	+	-	-	F	+	+	-	+	+	F	-	-	F	+	ND	+	V	+
Sarı pigment	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Alpha hemolysis	+	V	V	F	F	F	ND	-	-	F	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-
Beta hemolysis	-	V	V	F	F	-	ND	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-
pH 9.6	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
% 6.5 NaCl	+	+	+	+	+	+	-	+	+	F	+	+	-	+	+	+	-	ND

Çizelge 1.2 (devam): *Enterococcus* spp. özellikleri (Hartman ve ark., 1992;Manero ve Blanch, 1999).

Mikroorganizma	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. malodoratus</i>	<i>E. mundii</i>	<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. solitarius</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. sulfurous</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. flavescens</i>
4 ⁰ C' de gelişme	VY	VY	-	+	-	VY	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10 ⁰ C' de gelişme	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	(+)	-	-	+	+	+	-	(-)
45 ⁰ C' de gelişme	(+)	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	+	+	-	+	-	ND	(+)
50 ⁰ C' de gelişme	-	-	-	V	-	-	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
60 ⁰ C' de 15 dakika dayanıklılık	VY	VY	+	+	(+)	VY	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
60 ⁰ C' de 30 dakika dayanıklılık	VY	VY	+	+	F	VY	+	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
60 ⁰ C' de 60 dakika dayanıklılık	VY	VY	+	+	-	VY	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

V: % 26–74 oranında pozitif, VY: Veri yok, ND: saptanamamıştır, F: Farklı sonuçlar elde edilmiş, (+): % 75–89 oranında pozitif, (-): % 11–25 oranında pozitif, + : % 90'dan fazlası pozitif, - : % 10 ve daha az oranda pozitif.

1.3. Enterokokların Epidemiyolojisi

İnsanların ve hayvanların gastrointestinal sisteminde, ayrıca çevresel faktörlere dirençli olduğundan toprak, yüzey suları, sebze ve meyvelerde de bulunabilmektedirler. Enterokok türleri içerisinde *E. faecium* hayvan ve insan, *E. faecalis* insan gastrointestinal sistemlerinde, *E. mundtii* ve *E. casseliflavus* bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. İnsan dışkısında *E. faecalis* 10^5 – 10^7 kob/g, *E. faecium* 10^4 – 10^5 kob/g düzeyinde bulunabilmektedir (Fisher ve Philips, 2009; Petsaris ve ark., 2005 ve Vankerckhoven ve ark., 2008).

Enterokoklar özellikle immun sistemi baskılanmış insanlarda meydana gelen infeksiyonlarda fırsatçı mikroorganizmalar olarak belirtilmektedir. Enterokoklar en fazla endokarditis, bakteriyemi ve yara infeksiyonlarına neden olmakta, ayrıca sıklıkla solunum, üriner ve merkezi sinir sistem infeksiyonları ve daha ender olarak otitis, sinuzitis, septik artrit, endoftalmitis vakalarında rastlanmaktadır (Petsaris ve ark., 2005; Teixeira ve Merquior, 2013 ve Vankerckhoven ve ark., 2008).

Enterokoklar neden oldukları infeksiyonların yanı sıra 1970’li yıllardan beri hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli nedenlerinden biri olarak bilinmekte, aynı zamanda geliştirdikleri antibiyotik direnç nedeniyle gün geçtikçe artış gösteren bir şekilde halk sağlığını tehdit etmektedirler (Teixeira ve Merquior, 2013).

Antibiyotikler, infeksiyon tedavisinde kullanılmalarının yanı sıra hayvanlarda büyütme faktörü (antimicrobial growth promoter) veya performans artırıcı (antimicrobial performance enhancers [APE]) olarak yemlere katılarak kullanılmışlardır (Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000). Avilamisin, basitrasin, tilosin, spiramisin, virginamisin gibi büyüme faktörlerinin içinde VRE oluşumuna neden olan avoparsin, Avrupa ülkelerinde 1970’li yılların ortalarına kadar büyüme faktörü olarak kullanılmıştır (Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010; Robredo ve ark., 2000 ve Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000).

İnsan hekimliğinde antibiyotiklere çoklu direnç gösteren bazı Gram pozitif mikroorganizmaların yol açtığı infeksiyonların sağaltımında kullanılan vankomisin ve hayvanlarda antibiyotik büyüme faktörü olarak kullanılan avoparsin aynı grupta yer alan antibiyotiklerdir. Bu sebeple VRE, avoparsin eklenmiş rasyonlarla beslenen hayvanlarda ve hayvansal gıdalarda saptanabilmektedir. Avrupa Birliği'nde 2006 yılından itibaren antibiyotik büyüme faktörlerinin tamamıyla yasaklanmasına rağmen kazanılmış antibiyotik direncine sahip vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) klinik infeksiyonlarda büyük önem taşımakla birlikte tüm dünyanın dikkatini çeken önemli bir halk sağlığı problemi halini almıştır (Aarestrup, 1995 ve Giraffa, 2002). Dünya genelinde yürütülen araştırmalarda, tavuk etinin insanlarda nozokomiyal infeksiyonlara yol açan VRE için önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu bilinmektedir (Philips ve ark., 2004).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yılda 66.000 *Enterococcus* spp. infeksiyonunun gerçekleştiği, bunların 20.000'inin vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) tarafından oluşturulduğu ve bu infeksiyonların yaklaşık 1.300 kişinin ölümüne neden olduğu belirtilmektedir. Enterokokal infeksiyonlarının % 80-90'ından *E. faecalis* ve % 5-10'undan *E. faecium* sorumlu tutulmaktadır (Anon, 2013 ve Teixeira ve Merquior, 2013).

VRE'lerin insan infeksiyonlarına yol açması, kontamine gıdalar vasıtasıyla *Tn1546* geninin transferi ile şekillenmektedir. *Tn1546* geni aracılığıyla transfer edilebilen VRE'lerin iki farklı (*vanA* ve *vanB*) fenotipi bulunmaktadır (Giraffa, 2002; Peters ve ark., 2003 ve Robredo ve ark., 2000).

Çeşitli hayvansal gıdalarda VRE kontaminasyonunun incelendiği çalışmalardan birinde, Finlandiya ve Danimarka'daki hayvansal gıdaların VRE kontaminasyonu araştırılmıştır. Danimarka'da domuz etlerinde % 21, kanatlı etlerinde % 56 oranında VRE kontaminasyonunun olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada domuz eti izolatlarındaki eritromisin direnci % 91, kanatlı eti izolatlarının eritromisin direnci ise % 59 olarak bulunmuştur. Kinupristin/dalfopristin antibiyotiğine karşı direnç tavuk ve domuz eti izolatlarında sırasıyla % 37 - % 53

olarak saptanmıştır. Finlandiya'daki kanatlı ve domuz eti izolatlarının eritromisin direnci sırasıyla % 9-18 olarak belirlenmiştir (Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000). Bir başka çalışmada, Danimarka'da yemlere antibiyotik büyüme faktörlerinin katılmasının yasaklanmasının öncesinde, tavuk etlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının % 60-80'i antibiyotiklere dirençli iken, büyüme faktörlerinin yasaklanmasını takiben bu oranın % 5-35'e düştüğü kaydedilmiştir (Nollet, 2005).

VRE'nin gıdalara ulaşması birçok kaynaktan çevresel kontaminasyon yoluyla olmaktadır. VRE lağım sularının arıtıldığı makinelerden, çiftlik hayvanlarının dışkılarından, çiğ tavuk örneklerinden izole edilmektedir (Giraffa, 2002). Kesimhanelerdeki hijyen yetersizliği nedeniyle karkasların dışkı ile kontamine olması, hayvansal gıdaların VRE transferi için önemli bir etken haline gelmesine sebep olmaktadır (Lemcke ve Bülte, 2000).

Konu ile ilgili bir diğer araştırmada incelenen 150 kanatlı eti örneğinin % 30 oranda VRE ile kontamine olduğu belirlenmiştir (Borgen ve ark., 2001). Lopez ve ark. (2009), 129 tavuk eti örneklerinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının vankomisine karşı kazanılmış ve intrinsik direnç profillerini incelemiştir. Elde edilen izolatların vankomisine karşı kazanılmış ve intrinsik dirençleri sırasıyla % 4,7-13,2 olarak tespit edilmiştir. İzolatlardan yedisinin yüksek seviyede vankomisin direncine [MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu): 4-128 µg/ml] sahip olduğu belirlenmiştir.

1.4. Enterokokların Virülens Faktörleri

Enterokokların virülensinden, plazmidlerde kodlanan virülens genler ve genomda bulunan patojenite adaları sorumlu tutulmaktadır. Enterokokların başlıca virülens faktörleri; agregasyon faktörü (Aggregation Factor, AF), sitolizin, jelatinaz (gelatinase, GelE), ekstraselüler süperoksit, hiyaluronidaz (hyaluronidase, HYL), *Enterococcus faecalis* antijen A (EfaA) proteini, kapsül ve hücre duvarı polisakaritler, lipoteikoik asit (LTA), enterokok yüzey proteini (Enterococcal Surface Protein, ESP), enterokokların kollagenin adheziv matriks molekül

adezyonunu tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule Adhesin of Collagen From Enterococci, MSCRAMM), seks feromonları, biyofilm ve quorum sensing mekanizması bulunmaktadır (Chajęcka-Wierżchowska ve ark., 2017; Fisher ve Philips, 2009 ve Yuen ve Ausubel, 2014).

1.5. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç

1.5.1. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Enterokoklar birçok antibiyotiğe karşı intrinsik olarak direnç göstermelerinin yanı sıra, mutasyona uğrayarak ve diğer mikroorganizmalardan gen alarak kazanılmış dirence de sahip olabilmektedirler. Kazanılmış direnç genlerinin taşınması genellikle feromonları yanıtlayan konjugatif plazmidler ve transpozonlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Arias ve Murray, 2012).

1.5.1.1. İntrinsik (doğal) direnç

İntrinsik direnci kodlayan genler, diğer karakteristik özellikler gibi kromozomlarda bulunmaktadır (Murray, 1990).

Enterokoklar oksasilin gibi yarısentetik penisilinlere, aminoglikozitlere, düşük seviyede vankomisine (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* / *E. flavescens*), linkozamidlere, sefalosporinlere, β -laktamlara, sulfonamidlere, polimiklinlere, streptograminlere (*E. faecalis*), klindamisine ve monobaktamlara intrinsik olarak direnç göstermektedir (Klare ve ark., 2003 ve Leclercq, 1997).

Çoğu *E. faecium* izolatu 6'asetiltransferaz-asetilaz enzimi üretebildiği için doğal olarak amikasin, kanamisin, netilmisin ve tobramisine karşı direnç göstermektedirler (Sood ve ark., 2008).

1.5.1.2. Kazanılmış direnç

Enterokokların kazanılmış dirence sahip olmaları için:

- (i) Genetik değişimlerin kendi DNA'sında gerçekleşerek dirence neden olması veya donör (alıcı) hücrelerden transfer edilebilir direncin kazanılması,
- (ii) Antibiyotiklerin temel veya ek tedavi seçeneği olarak kullanılmaları gerekmektedir (Klare ve ark., 2003).

Enterokoklar çeşitli mikroorganizmalardan horizontal gen transferiyle gen alışverişi yaparak antibiyotik direncine sahip olmaktadır. Bu mikroorganizmalar arasında stafilokoklar, listeria türleri, streptokoklar, laktobasillus, laktokokus ve bifidobakterler bulunmaktadır (Werner ve ark., 2013).

Enterokoklarda kazanılmış direnç, ampisilin, penisilin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, siprofloksasin, gentamisin, streptomisin, vankomisin, rifampin, yüksek seviyede klindamisin, aminoglikozit ve β -laktamlar, aztreonam, trimetoprim-sülfametoksazol, sefalosporinler, kinolonlar ve glikopeptidler gibi birçok antibiyotiğe karşı görülmektedir. Özellikle vankomisin, β -laktamlar ve aminoglikozitlere olan direnç tedavi seçeneklerinin daralmasına neden olmaktadır (Franz ve ark., 2001; Klare ve ark., 2003; Leclercq, 1997; Rice, 2001 ve Werner ve ark., 2013).

Glikopeptidlere karşı olan direncin önemi bu antibiyotiklere karşı olan direncin çoğunlukla transfer edilebilir olmasıdır. Tüm bu antibiyotik direncini kodlayan genler konjugatif plazmid veya transpozonlar vasıtasıyla enterokoklara ya da *Staphylococcus aureus* gibi daha virulent patojenlere transfer edilebilmektedir. Kazanılmış antibiyotik direncine sahip vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) klinik infeksiyonlarda büyük önem taşımaktadır (Giraffa, 2002).

Sefalosporinler ve aminoglikozitler gibi Gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olan antibiyotiklere karşı kazanılan direnç *E. faecium*'da *E. faecalis*'e oranla daha sık görülmektedir. Ayrıca, yapılan bir çalışmada *E. faecium* izolatlarının vankomisine karşı % 60, ampisiline karşı ise % 80 dirençli olduğu belirlenmiştir ve *E. faecalis*'e göre çok daha fazla dirençli olduğu bilinmektedir (Sood ve ark., 2008 ve Witte, 1999).

1.5.1.3. Plazmid ve transpozonlar

Enterokoklardaki kazanılmış antibiyotik direncinden sorumlu olan genler feromon aracılıklı konjugatif plazmid ya da transpozonlar tarafından transfer edilebilmektedir. Bu sayede direnç genleri sadece antibiyotik duyarlı enterokoklara değil diğer patojen mikroorganizmalara da transfer edilebilmektedir (Giraffa, 2002 ve Klare ve ark., 2003).

Plazmidler birden fazla antibiyotiğe karşı direnci kodlayabilen DNA parçalarıdır. Transpozonlar ise bir DNA molekülünden diğerine, non-homolog bölgelere yerleşerek transloke olabilen (yer değiştirebilen) DNA elementleridir. DNA'dan DNA'ya atlayabilen genler anlamında 'jumping genes' olarak da adlandırılmaktadırlar. Transpozonlar kendi translokasyonlarından sorumlu transpozaz enzimlerini kodlayan genlerini, antibiyotik direnç genlerini ve ayrıca bazı katabolik genleri taşırlar. Transpozisyon en etkili DNA alışverişi yöntemlerinden biri olup donör hücrede kimi zaman replikon füzyonu, delesyon veya inversiyon gibi DNA'da çeşitli düzenlenmelere yol açmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000 ve Threlfall, 1992).

Gram negatif mikroorganizmalardaki konjugasyon sistemlerinin aksine, enterokok türlerindeki konjugasyon için piluslar değil feromonlara duyarlı sistem gerekmektedir (Fisher ve Phillips, 2009). Konjugatif plazmidlere sahip mikroorganizmalar genetik değişim için plazmid spesifik feromonlara yanıt vermektedir ve bu mikroorganizmalar genelde konjugasyon için sınırlı alıcı çeşitliliğine sahiptir. Genetik elementlerin bu lateral transferi antibiyotik direncinin

yayılmasına sebep olur. Plazmid bulunan enterokok türleri aynı zamanda transpozonların transfer aracı da olabilmektedir (Williams ve Hergenrother, 2008).

E. faecalis'de feromonlar vasıtasıyla uyarılabilen plazmidlerin en fazla çalışılanları pCF10, pAD1, pPD1'dir. Bu plazmidlerden serbest bırakılan feromonlar ise sırasıyla; cCF10, cAD1 ve cPD1'dir. pPD1, transkripsiyonda etkili olan ve *traE* geni tarafından kodlanan düzenleyici protein olarak bildirilmektedir (Folli ve ark., 2008). pAD1 plazmidinin aynı zamanda *E. faecalis* ile ilişkili Tn917 transpozonunu taşıdığı bildirilmiştir (Fisher ve Phillips, 2009). Bu plazmidlerin transferi, plazmid bulunmayan alıcı hücreler tarafından spesifik cinsiyet feromon peptidlerine yanıt olarak gerçekleşmektedir. Verici hücre tarafından eksojen feromonun alınması, konjugasyon sürecine ilişkin proteinlerin eksprese olmasına neden olmaktadır (Clewell ve ark., 2002).

Enterokokal plazmidler aynı zamanda virulens faktörlerin genetik olarak değişiminde de görev alabilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009). Alıcı hücre yüzeyinde agregasyon faktörünün üretimi, enterokokal bağlanma faktörüne (Enterococcal Binding Factor, EBS) bağlanarak verici hücre ile temasa geçmesini sağlamaktadır. Böylece alıcı hücrede konjugasyon ve antibiyotik direncin geçişi gerçekleşebilmektedir (Clewell ve ark., 2002).

E. faecalis'te RepA, RepB, RepC proteinleri ve *par* lokusu; feromonları cevaplayan pAD1 replikonunun düzenlenmesinde görev almaktadırlar. *repA* geni replikasyonu başlatan öncü proteini kodlamakta, *repB* ve *repC* ise replikasyon sıklığının kontrolü ve plazmidin stabilitesinin sağlanmasında görev almaktadır (Weaver ve ark., 2009).

Yapılan bir çalışmada, konjugatif çoklu direnç plazmidi pRE25'nin bir sosisten izole edilen *E. faecalis* izolatından elde edildiği bildirilmektedir. Bu plazmidin 50.237 bp'lik ağırlığa sahip olduğu ve diğer Enterokoklara, *Listeria innocua*'ya ve *Lactococcus lactis*'e konjugasyonla transfer edilebildiği belirtilmektedir (Teuber, 2001).

Tn1546 transpozonunun *E. faecalis*'ten *S. aureus*'a vankomisin direncini transferi, bakteriler arasında horizontal gen transferinin önemini göstermektedir (Macovei ve Zurek, 2006).

1.5.1.4. Horizontal gen transferi

İnsan gastrointestinal sistemi antibiyotik direnç genlerinin oluşumu ve yayılımı için gerekli birçok faktörün bir arada bulunduğu bir ortamdır. Direnç genlerinin horizontal olarak transferinde birçok mekanizma bulunmakla birlikte mikroorganizmalar direnç genlerinin transferini en çok konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon mekanizmalarıyla gerçekleştirmektedirler (Huddleston, 2014).

Direnç genlerini taşıyan genetik materyal ve plazmidler mikroorganizmalar arasında transdüksiyon, konjugasyon, transformasyon gibi mekanizmalar aracılığıyla aktarılabilmektedir (Verraes ve ark., 2013).

Mikroorganizmalar arasında antimikrobiyal direnç genlerinin transferinde önemli rolü olduğu bilinen konjugasyon, mikroorganizmaya ait iki hücrenin teması ile genetik materyalin aktarılmasıdır. Türler arası plazmid aktarımının in vivo koşullarda gerçekleşebilmesi ve direnç plazmidlerinin Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizma türleri arasında da aktarılabilmesi büyük önem taşımaktadır (Huddleston, 2014 ve Verraes ve ark., 2013).

Birçok antibiyotik direnç geninin hayvansal kökenli *E. faecium*'lardan insan gastrointestinal sistemindeki *E. faecium*'lara konjugasyon mekanizmasıyla aktarılabildiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, farelerin gastrointestinal sistemi üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda vankomisin direncinin *E. faecium* izolatlarından *E. faecalis* izolatlarına in vivo koşullarda transferinin gerçekleştiği belirtilmiştir. Hayvansal kökenli enterokok izolatlarından *vanA* geninin transferi, insan gastrointestinal sistemindeki enterokokların vankomisin direnci kazanmasına neden olmuştur (Moubareck ve ark., 2003).

Transformasyon, mikroorganizmaya ait bir hücrenin içine farklı bir mikroorganizmanın DNA'sının girmesi ve bu DNA'nın konak mikroorganizmanın genomunun bir parçası haline gelerek hücrenin değişime uğraması olarak bilinmektedir. Mikroorganizmlara ait DNA'lar, gıda işletmelerinde maruz kaldıkları fiziksel ve kimyasal işlemleri sırasında savunmasız halde olmalarına rağmen işletmelerde biyofilm varlığında DNA'nın korunabildiği gösterilmiştir (Huddleston, 2014 ve Verraes ve ark., 2013).

Horizontal gen transferinde rol oynayan bir diğer önemli mekanizma olan transdüksiyon, genetik materyalin bir mikroorganizmadan diğerine nakledilmesidir. Transformasyon ya da konjugasyonun tersine, bakteriyofajlar aracılığıyla genetik materyalin aktarılması henüz netlik kazanmamıştır. Bakteriyofajlar tarafından konakçı genomunun bir kısmının kopyalandığı, bu kopyalama sırasında transdüksiyon olayının gerçekleştiği bilinmektedir (Huddleston, 2014 ve Verraes ve ark., 2013).

1.5.2. Enterokokların Direnç Geliştirdikleri Antibiyotikler

1.5.2.1. Aminoglikozitlere direnç

Enterokoklar aminoglikozitlere karşı değişen konsantrasyonlarda [MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu): 4-256 µg/ml] intrinsik direnç göstermektedir. Enterokokların aminoglikozitlere gösterdikleri intrinsik direnci elimine edebilmek için aminoglikozitlere ek olarak β-laktamlar gibi hücre duvarına zarar veren antibiyotikler kullanılarak aminoglikozidin hücre içine penetrasyonunu gerçekleştirilebilmekte ve sinerjizm sağlanabilmektedir (Chow, 2000 ve Klare ve ark., 2003).

Enterokoklar aynı zamanda aminoglikozitleri modifiye edici birçok enzim tarafından kodlanan, aminoglikozitlere karşı kazanılmış direnç genlerine sahiptirler ve bu durum aminoglikozitlere karşı yüksek seviyede direnç göstermelerine neden

olmaktadır. Aminoglikozitlere karşı olan direnç $MIC \geq 2000 \mu\text{g/ml}$ olduğunda yüksek seviye dirençten bahsedilmektedir. Aminoglikozit modifiye edici enzimler, aminoglikozit molekülündeki amino ve hidroksil grubu arasındaki kovalent bağlanmanın modifikasyonunu katalize eder. Bu etkisini ise antibiyotik ve bakteriyal ribozom arasındaki bağlayıcı afiniteyi düşürerek gerçekleştirmektedir (Arias ve Murray, 2012 ve Chow, 2000).

Enterokokların ciddi enterokokal infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan bir aminoglikozid olan gentamisine önemli derecede direnç gösterdiği belirlenmiştir. Gentamisin direnci iki fonksiyonlu protein olarak adlandırılan ve *aph(2'')-Ia/acc(6')-Ie* enzimini kodlayan bir transpozon aracılığıyla gerçekleşmektedir. *Aph(2'')-Ia/acc(6')-Ie* enzimi iki aktif bölgeye sahip olan protein tarafından kodlanır ve 2''fosfotransferaz/6'asetiltransferaz fonksiyonlarına sahiptir. Bu enzim gentamisinin yanı sıra streptomisin hariç klinik olarak kullanılabilecek tüm aminoglikozitlere (tobramisin, netilmisin, amikasin ve kanamisin) karşı dirence de neden olmaktadır. Bu nedenle gentamisin direnci tobramisin, netilmisin, amikasin ve kanamisin aminoglikozitlerine olan direnci de göstermektedir (Arias ve Murray, 2012; Çetinkaya ve ark., 2000 ve Sood ve ark., 2008).

E. faecalis'teki gentamisine karşı yüksek seviye direnci kodlayan genin DNA sekansının, stafilokoklardaki gentamisin direnç geninin sekansı ile aynı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle enterokoklardaki gentamisin direncinin stafilokoklardakine aynı transpozon üzerinden kodlandığı düşünülmektedir (Murray, 1998).

Gentamisin ve streptomisine karşı direnç farklı mekanizmalarla gerçekleşmesine rağmen, her iki antibiyotiğe karşı olan direncin de test edilmesi gerekir. Streptomisin direnci streptomisin adeniltransferaz üretimiyle ilişkilidir ve streptomisin direncine sahip kültürler gentamisine karşı duyarlı kalmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000 ve Sood ve ark., 2008).

Streptomisine karşı yüksek seviye direnç ($MIC \geq 1000 \mu\text{g/ml}$) ribozomal olarak da gerçekleşebilir yani ribozomların streptomisin inhibisyonuna dirençli hale

geldiği bir mutasyondan kaynaklanabilmektedir. Kanamisine karşı yüksek seviye direnç ise oldukça yaygın görülen bir durumdur ve 3'fosfotransferaz [*aph* (3')] sentezinden kaynaklanmaktadır. Bu enzim 3'-hidroksil grubunun fosforilasyonu, hücre duvarı aktif ajanları ve amikasin arasındaki sinerjizmi elimine ettiği için önem arz etmektedir (Murray, 1998).

Streptomisine karşı yüksek seviye direnç, genellikle S12 ribozomal proteinin değişmesine neden olan ribozomal mutasyonlardan veya *ant*(3'')-Ia/*ant*(6')-Ia aminoglikozit nükleotidil transferaz enziminin kazanılmasından kaynaklanmaktadır (Arias ve Murray, 2012).

Tüm *E. faecium* türleri kromozomal olarak kodlanan aminoglikozit asetiltransferaz [*aac* (6')-Ii] enzimini üretmektedir. Bu enzim hücre duvarı aktif antimikrobiyalleri ve tobramisin, kanamisin, netilmisin ve sisomisin aminoglikozitleri arasındaki sinerjiyi elimine eder. Aminoglikozit fosfotransferaz [*aph*(3')-IIIa] enzimi kanamisine karşı yüksek seviye direnç gelişimine, aminoglikozit nükleotidiltransferaz [*ant*(4')-Ia] enzimi ise tobramisin, amikasin, kanamisine karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. *Aph*(3')-IIIa ve *ant*(4')-Ia genlerinden her ikisi de enterokoklarda amikasinine karşı 64-256 µg/ml MIC değerinde direnç gelişimine neden olmasına rağmen, bu genlerden yalnızca birine sahip olan izolatlar ampisilin-amikasin sinerjizmine direnç göstermektedir (Chow, 2000).

Aph(2'')-Ic, *aph*(2'')-Id, *aph*(2'')-Ib genlerinin de aminoglikozit direnç genleri olduğu belirtilmiştir. Bu gene sahip enterokoklar 256-384 µg/ml MIC değerinde gentamisin direncine sahip olmalarının yanı sıra, ampisilin-gentamisin sinerjizmine de dirençlidirler (Murray, 1998; Chow, 2000). *Aph*(2'')-Id geni ise ilk olarak *E. casseliflavus*'un kan izolatından izole edilmiştir. Bu genin gentamisinin yanı sıra, tobramisin, kanamisin, netilmisin ve dibekasin antibiyotiklerine karşı direnç oluşumunda da rol aldığı bildirilmektedir. Bu gene sahip enterokoklarda, her beş antibiyotik için de MIC değerinin 2000 µg/ml'nin üzerinde olduğu bildirilmiştir. En son identifiye edilen gentamisine karşı yüksek seviye direnç geni *aph*(2'')-Ib'dir. Bu gene sahip izolatların da gentamisin, tobramisin, kanamisin, netilmisin ve dibekasin

antibiyotiklerine karşı yüksek seviye direnç gösterdiği bildirilmektedir. Enterokokların aminoglikozitlere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları Çizelge 1.3’de gösterilmektedir (Chow, 2000 ve Klare ve ark., 2003).

Çizelge 1.3. Enterokokların aminoglikozitlere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları (Klare ve ark., 2003).

Direnç mekanizması	Direnç genleri	Direnç spektrumu
Aminoglikozit modifiye edici enzimler	<i>aph(2'')-Ib</i>	Gentamisin, Tobramisin, Kanamisin, Netilmisin, Dibekasin (<i>E. faecium</i> ’un klinik izolatlarında saptanmıştır.)
	<i>aph(2'')-Ic</i>	Gentamisin, Tobramisin, Kanamisin, Dibekasin
	<i>aph(2'')-Id</i>	Gentamisin, Tobramisin, Kanamisin, Netilmisin, Dibekasin
	<i>aph(2'')-IIIa</i>	Kanamisin
	<i>aac(6')-Ie/</i>	Streptomisin dışındaki tüm aminoglikozitler
	<i>aph(2'')-Ia</i>	
	<i>aac(6')-li</i>	Tobramisin, Kanamisin, Netilmisin, Sisomisin (sadece <i>E. faecium</i> ’da)
	<i>ant(4')-Ia</i>	Tobramisin, Amikasin, Kanamisin, Dibekasin
	<i>ant(6)-Ia</i>	Streptomisin
	<i>ant(3'')-Ia</i>	Streptomisin
	<i>ant(9)-Ib</i>	Streptomisin

1.5.2.2. Beta laktamlara karşı direnç

Beta laktam antibiyotikleri, tek başına ya da aminoglikozitlerle kombine olarak enterokokal infeksiyonların tedavisinde yarım yüzyıldan fazladır kullanılmaktadır. 1990’lı yıllarda ilk kez β -laktamaz enzimine sahip *E. faecalis*’lerden kaynaklı bir salgın meydana gelmesiyle β -laktamaz enzimine sahip enterokoklar gündeme gelmiştir (Arias ve Murray, 2012).

Beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç, enterokokların beta laktamaz enzimine sahip olmalarıyla gerçekleşmektedir. Bu enzim penisilin, ampisilin ve piperasilini yıkımlamaktadır. Beta laktamaz üretimini kodlayan transfer edilebilir plazmid, aynı zamanda yüksek derecede gentamisin direncini de kodlamaktadır (Sood ve ark., 2008). β -laktamlara gösterilen direnç etkeninin Tn552 transpozonu

üzerine lokalize olması dolayısıyla, β -laktamaz üretimi ve direncinin *S. aureus*'tan aktarıldığı düşünülmektedir (Witte, 1999).

Enterokokların büyük çoğunluğu düşük afiniteli penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) nedeniyle beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç göstermektedirler. Bu proteinler beta laktam antibiyotiklerinin düşük seviyede varlığında dahi hücre zarı komponentlerini sentezleyebilirler. PBP5'in aşırı üretimi sonucu *E. faecium*'da yüksek seviyede (MIC: 16-64 μ g/ml) beta laktam direnci görülürken, *E. faecalis* plazma konsantrasyonuna ulaşan penisilin varlığında (MIC 1-8 μ g/ml) inhibe olabilmektedir. PBP5'in diğer PBP'ler olmadan da görevini yerine getirebilmesi, hücre duvarı sentezinde gerekli olan tüm fonksiyonları yerine getirebildiğini göstermektedir (Murray, 1990 ve Rice, 2001).

1.5.2.2.1. Penisilin direnci

Enterokokal penisilinaz geni, stafilokokal tip A penisilinazı kodlayan gen ile aynıdır ve genellikle gentamisine karşı HLR gösteren izolatlardan izole edilmekte, aynı zamanda kendisinin de *aph(2'')*-*Ia/acc(6')*-*Ie*'ye sahip olduğu, transfer edilebilir bir plazmid üzerinde bulunmaktadır. Penisilinaza sahip enterokoklar genel olarak penisilin ile birlikte aynı zamanda ampisilin ve üreidopenisilinlere de yüksek seviyede direnç göstermektedir. Penisilinaz aktivitesi klavulanat, sülbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleriyle önlenabilmektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda beta-laktamaz inhibitörlerinin, ampisilinin veya penisilinin endokarditis üzerinde tedavi edici etkisini arttırdığı belirlenmiştir (Murray, 1998).

E. faecium penisiline *E. faecalis*'ten 4-16 kat daha duyarlıdır. Penisilin direnci direkt olarak, üretilen PBP5 miktarıyla ilişkilidir. PBP5 üretiminde azalma olan *E. faecium* türleri yüksek seviye penisilin direncine sahip kültürlerin oluşumuna neden olmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000).

Penisilinaz üretimi olmadan kazanılan penisilin direnci ise genel olarak *E. faecium*'dan izole edilmektedir. PBP'lerin aşırı üretimi ve bu enzimlerden birindeki azalma, bu direncin mekanizmasını oluşturur (Murray, 1998).

1.5.2.2.2. Ampisilin direnci

Enterekoklardaki artan ampisilin direnci; beta laktamaz üretimi, PBP5 ekspresyonu ya da PBP5 yapısında gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. PBP5'teki değişimlerden kaynaklanan ampisilin direnci, *E. faecium*'dan kaynaklanan infeksiyonlar için klinik bir problemdir. Klinik izolatlarda genel olarak ampisiline karşı gösterilen MIC değerleri; *E. faecalis*'te 0.5-4.0 µg/ml iken, *E. faecium*'da 4-8 µg/ml'dir (Arias ve Murray, 2012 ve Rice, 2001).

Yüksek seviye ampisilin direnci (MIC $\geq$ 128 µg/ml) Amerika'da 1970-1980 yılları arasında ortaya çıkmıştır. Bu izolatların moleküler analizinde, artan ampisilin direncinin, PBP5'in ampisiline bağlanma afinitesini düşüren pbp5 genindeki mutasyonla ilgili olduğu görülmüştür (Arias ve Murray, 2012).

E. faecalis'te ender görülen ampisilin direnci, *E. faecium*'un hastane kaynaklı izolatlarının yaklaşık % 90'ında görülmektedir (Arias ve Murray, 2012).

Birçok vankomisin dirençli enterekokun aynı zamanda ampisiline karşı yüksek seviye direnç göstermesi, vankomisin ve ampisilin dirençlerinin transfer edilebilir olmalarının bağlantılı olmasıyla açıklanabilmektedir (Murray, 1998).

β -laktamaz üretiminin terapötik bir sorun değil, diagnostik açıdan büyük bir sorun teşkil ettiği bildirilmektedir. Çünkü bu enzime sahip izolatlar testlere yalnızca yüksek konsantrasyonlarda pozitif vermektedir. Klinik infeksiyonlarda beta laktam antibiyotikleri kullanılmadan önce beta laktamaz üretimini saptamak amacıyla, hastalardan elde edilen izolatlar kromojenik bir sefalosporin olan nitrosefinile test edilmelidir. Enterokokların β -laktam antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç

mekanizmaları Çizelge 1.4’de verilmiştir (Arias ve Murray, 2012; Klare ve ark., 2003 ve Sood ve ark., 2008).

Çizelge 1.4. Enterokokların β -laktam antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç mekanizmaları (Klare ve ark., 2003).

Direnç mekanizması	Transfer edilebilen	Direnç genleri	Direnç spektrumu
Düşük afiniteli PBP5		pbp5	Tüm sefalosporinler ve penisilinlere karşı düşük seviye direnç
PBP5’in aşırı üretimi		pbp5	Tüm β -laktamlara yüksek seviye direnç
	Tn552, Tn5385	blaZ	Penisilinler
β -laktamaz geçişi (bypass)			Penisilinlere yüksek seviye direnç

1.5.2.3. Glikopeptidlere direnç

Glikopeptid antibiyotiklerden olan vankomisin ve teikoplaninlere dirençli enterokoklar, nozokomiyal infeksiyonlardan izole edilmekte ve bu nedenle klinik olarak önem taşımaktadırlar. Bu sınıfa dahil olan antibiyotikler, çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizmalara karşı kullanılmalarının yanısıra ampicilin ve penisilin gibi diğer antibiyotiklere karşı alerjik reaksiyonlarda da kullanıldıkları için klinik olarak büyük öneme sahiptirler. Aynı zamanda, glikopeptid antibiyotikler nozokomiyal infeksiyonlarda sıklıkla son tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadırlar (Giraffa, 2002).

Glikopeptidlere dirençli enterokoklar sağlık açısından tehdit edici olmalarının yanı sıra diğer mikroorganizmalara yüksek seviye glikopeptid direncini transfer edebilmeleri açısından da önemlidirler (French, 2010).

Enterokoklarda glikopeptid direnci iki komponentli sistem tarafından gerçekleştirilmektedir. İki komponentli sistemde gerçekleşen iki mekanizma;

- 1- Peptidoglikan öncü maddesinin D-Alanin (D-Ala) terminalinin yüksek seviye direnci sağlayan D-Laktat (D-Lac) ile ya da düşük seviye direnci sağlayan D-Serin (D-Ser) ile yer değiştirmesi,
- 2- Spesifik D,D-dipeptidazlar ve karboksipeptidazlar tarafından D-Ala-D-Ala ile sonlanan öncü maddelerin yıkılmanmasıdır (Arias ve Murray, 2012).

D-Lac ile yer değiştirme, afinitede yaklaşık 1000 kat düşüş olmasına sebep olmaktadır. D-Ala ve D-Ser'in yer değiştirmesi de, düşük bir düzey olmasına rağmen, peptidoglikan öncü maddeleri ile glikopeptidlerin bağlanma afinitesini düşürmektedir. D-Ala-D-Ser vankomisine dirençte yedi kat düşüş sağlamakta ve böylece duyarlı hedef hücre uzaklaştırılmaktadır (Arias ve Murray, 2012 ve Fisher ve Phillips, 2009).

Yapılan çalışmalara göre infekte hastada antibiyotiklere duyarlı kültürler yerine glikopeptidlere dirençli enterokoklar (GRE) var ise klinik tedavilerde başarısızlık oranı % 20 artmakta ve ölüm oranı % 27'den % 52'ye çıkmaktadır (Brown ve ark., 2006).

Enterokoklarda glikopeptit antibiyotiklerine karşı direnç gelişimi *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG* genleri ile ilişkilidir. Bunlardan *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG* sonradan kazanılmış direnç genleri; *vanC*₁ ve *vanC*₂/*vanC*₃ ise intrinsik direnç genleri olarak bilinmektedir. En fazla görülen direnç genotipleri *vanA* ve *vanB*'dir. Yüksek düzey teikoplanin ve vankomisin direncini *vanA* geni kodlamaktadır. *VanA* tipi glikopeptid direnci enterokok türlerinin büyük bir çoğunda saptanırken, *VanB* tipi direncin ise daha sık olarak *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında bulunduğu belirtilmektedir. *VanB* tipi glikopeptid direnci farklı konsantrasyonlarda vankomisin direncine neden olmakta fakat teikoplanine karşı direnç göstermemektedir. *VanD* fenotipi; vankomisine karşı orta düzeyde, teikoplanine karşı ise düşük düzeyde direnç göstermektedir. *VanE* fenotipi; vankomisine karşı düşük düzey direnç göstermekte fakat teikoplanine karşı duyarlılık göstermektedir. *VanC*₁, *vanC*₂ ve *vanC*₃ fenotipleri sırasıyla *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* türlerine spesifik genlerdir. *VanG* fenotipi; vankomisine orta düzey direnç göstermekte fakat

teikoplanine duyarlılık göstermektedir. *VanG* fenotipi çoğunlukla *E. faecalis* klinik izolatlarında saptanmıştır. *VanA* ve *vanB*'nin her ikisi de transpozonlarda lokalize olmakta fakat plazmid tarafından diğer mikroorganizmalara aktarılabilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009; Klare ve ark., 2003; Perez-Hernandez ve ark., 2002 ve Werner ve ark., 2008).

1.5.2.3.1. Vankomisin direnci

Vankomisinin klinikte 1972'de kullanılmaya başlanması ardından, 1986 yılında Avrupa'da vankomisin dirençli enterokokların varlığına rastlanmıştır. Hemen sonrasında *E. faecalis* klinik izolatından *vanB* geninin varlığı ile Amerika'da VRE bildirilmiştir. Avrupa Birliği ülkelerindeki insan VRE infeksiyonlarının insidensinin oranı % 1-3'tür. Amerika'daki yüksek ve artan orana göre oldukça düşüktür. CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezleri) verilerine göre 1989 yılında % 0,3 olan Amerika'daki bu oran, 1997 yılında % 10,5'e, 1999 yılında ise % 24'e yükselmiştir (Klare ve ark., 2003; Metan ve ark., 2005; Anon, 1997; Sood ve ark., 2008).

Amerika'da her yıl 66.000 klinik kaynaklı enterokok infeksiyonunun meydana geldiği, bunlardan 20.000'inin vankomisine direnç gösterdiği ve vankomisin dirençli enterokoklara bağlı yaklaşık 1.300 ölüm vakasının görüldüğü belirtilmektedir (Anon, 2013).

Büyüme faktörü olarak kullanılan antibiyotiklerin sürekli kullanımının antibiyotiklere karşı direnç gösteren enterokokların gelişimini artırıcı bir etken olduğu bilinmektedir (Giraffa, 2002). Amerika ve Avrupa'da VRE dağılımının epidemiyolojik verileri farklılık göstermektedir. Vankomisin direncinin ortaya çıkmasına; klinik infeksiyonlarda bu antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılması ve yem katkısı olarak kullanımının yasaklandığı 1998 yılına kadar avoparsinin Avrupa'da hayvan yetiştiriciliğinde büyüme faktörü olarak kullanılması neden olmuştur. Avoparsinin hayvanların beslenmesinde kullanılması *vanA* geni

aracılığıyla sağlanan direncin primer kaynağı olarak bilinmektedir. Avoparsinin kullanımıyla hayvanlarda vankomisine dirençli enterokoklar gelişmiş ve bu hayvanlardan elde edilen etler de insanlar için infeksiyon kaynağı olmuştur. Hastanede yatan hastalardaki VRE infeksiyonlarının varlığı da, kişiler daha önce hastanede yatmadılar ve antibiyotik kullanmadılarsa, VRE'nin gıda yoluyla alındığını göstermektedir. Günümüzde avoparsin kullanımı Avrupa'da yasak olmasına rağmen, Amerika'da kullanılmasına hiçbir zaman izin verilmemiştir. Amerika'da VRE'nin varlığı ve yayılmasının klinik kaynaklı olduğu bilinmektedir (Anon, 1998; French, 2010; Giraffa, 2002; Mannu ve ark., 2003 ve Mundy ve ark., 2000).

Vankomisin direncinin, büyüme faktörü olarak avoparsin kullanılan hayvan izolatlarından izole edilmesinin yanı sıra hastane dışındaki insan popülasyonlarından elde edilen izolatlardan da izole edilmesi, dirençli kültürlerin yayılarak çoğaldığını, insan ve hayvanlar arasında dirençli gen transferinin gerçekleştiğini göstermiştir. VRE'nin gıdalara ulaşması birçok kaynaktan çevresel kontaminasyon yoluyla olmaktadır. VRE lağım sularının arıtıldığı makinelerden, çiftlik hayvanlarının dışkılarından, çiğ tavuk örneklerinden izole edilmektedir. Bu bilgiler çiftlik hayvanlarında avoparsin veya diğer antibiyotiklerin kullanımıyla, insanlarda gıda yoluyla VRE kolonizasyonunun gerçekleştiğini doğrulamaktadır (Giraffa, 2002).

Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürvelans Programı (European Antimicrobial Resistance Surveillance Program)'nın 2008 yılında yayınladığı rapora göre, 33 ülkenin 23'ünde vankomisin dirençli *E. faecium* varlığı bildirilmiş ve bu ülkelerin 3 tanesinde % 25 üzerinde bir oranla (Yunanistan > % 28, İrlanda % 35, Birleşik Krallık % 28) direnç gelişimi gözlenmiştir (Anon, 2010).

Vankomisin dirençli enterokokların global olarak infeksiyonların nedeni olarak gösterilmesinin nedenleri şunlardır:

- i- Kazanılmış vankomisin direnci, hastalıkların tedavisinde kullanılan seçenekleri kısıtlamaktadır.

- ii- Enterokoklardan *S. aureus*'a vankomisin direnç geni transferi olduğu belirlenmiştir.
- iii- Amerika ve Avrupa'da vankomisin dirençli enterokokların dağılımı farklılık göstermektedir.
- iv- Vankomisin direncini önleme ve kontrol stratejileri yetersiz kalmaktadır (Mundy ve ark., 2000).

Enterokoklarda vankomisin direncinden sorumlu iki intrinsik ve beş kazanılmış olmak üzere yedi direnç genotipi (*vanA*, B, C₁, C_{2/3}, D, E, G) gözlenmektedir. *VanA*, B, D, E, G sonradan kazanılmış direnç genleri iken; *vanC*₁ ve *vanC*_{2/3} intrinsik direnç genleridir. Başlıca üç direnç mekanizması; *vanA*, B, C genleri tarafından sağlanmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009 ve Klare ve ark., 2003).

VanA direncine sahip kültürler yüksek seviye vankomisin (MIC $\geq$ 64 μ g/ml) ve teikoplanin (MIC $\geq$ 16 μ g/ml) direncine sahiptir. Direncin vankomisin, teikoplanin, avoparsin, ristosetin gibi glikopeptid yapıdaki maddelerden veya basitrasin, polimiksin B, robenidin gibi glikopeptid yapıda olmayan ajanların kullanımından ileri gelebileceği belirtilmektedir. *VanA* fenotipinin ekspresyonu için gerekli genler Tn1546 transpozonu üzerinde bulunmaktadır. *VanB* direncine sahip izolatlar ise vankomisine karşı değişen konsantrasyonlarda (MIC: 4- $\geq$ 1000) direnç gösterirken, teikoplanine karşı duyarlılık göstermektedirler. *VanB* direnç determinantları enterokok kültürleri arasında transfer edilebilmektedirler (Çetinkaya ve ark., 2000).

İntrinsik *vanC* direnci *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* türlerinde spesifik olup, *vanC* operonu kromozomal olarak konumlanmış ve transfer edilememektedir. *VanC* operonuna sahip enterokoklar vankomisine düşük seviyede direnç (MIC 4-32 μ g/ml) gösterirken, teikoplanine karşı duyarlıdırlar (Çetinkaya ve ark., 2000; Fisher ve Phillips, 2009 ve Klare ve ark., 2003).

Bu sınıflandırmanın dışında kalan durumlar da mevcuttur. *VanA* fenotipini belirleyen genetik determinantlar *E. gallinarum* ve diğer enterokoklardan da izole edilmiştir. *E. avium* izolatlarında, teikoplanine ve MIC değeri 16 μ g/ml düzeyinde

vankomisine karşı direnç gösteren *vanA* direnç determinantları saptanmıştır. *VanB* mutantları teikoplanine karşı da direnç gösterebilmekte ve böylelikle *vanA* fenotipinden ayıramamaktadır. Yine de yapılan bu fenotipik sınıflandırma önemlidir çünkü genel olarak genotipik sınıflandırmayla eşleşmekte ve laboratuarda daha düşük maliyete bilgi sahibi olunmasını sağlamaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000).

1.5.2.3.1.1.Vankomisinin genotipik sınıflandırması ve direnç mekanizmaları

1.5.2.3.1.1.1. Peptidoglikan sentezinde vankomisinin rolü

Enterokoklarda peptidoglikan sentezi sırasında peptidoglikan transglikozilasyonu ve transpeptidasyonunda substrat görevi yapan muramil pentapeptid ile ilişkili olan lipid II, antibiyotiklerin hedef aldığı moleküllerden bir tanesidir. Vankomisin, lipid II'nin muramil pentapeptid kısmındaki D-Ala-D-Ala terminalini hedef almaktadır. Hedef alınan bu yapıdaki değişiklik, hem substratın tanınmasında hem de enzimlerin düzenlenmesinde değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle enterokoklarda görülen *vanA* ve *vanB* tipi vankomisin direncinin horizontal olarak transfer edilmesi, birçok genden oluşan operonun aktarılması sonucu oluşmaktadır. Bu genler peptidoglikan sentezini değiştirerek, vankomisine bağlanmaksızın lipid II yerine geçebilen farklı ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır (Silver, 2011).

VanA geni normal olmayan D-Ala-D-Ala ligaz enzimini kodlar ve bu enzim D-Ala-D-Ala ucuna sahip hücre duvarı peptidoglikan öncü maddeleri ile glikopeptidlere bağlanamayan D-Ala-D-Lac'ın yer değiştirmesini katalize eder. Vankomisin hücre duvarı peptidoglikan tabakasının D-Ala-D-Ala terminaline (ucuna) bağlanır. Bu terminal dipeptid, transpeptidasyon reaksiyonu ile peptidoglikanın bitişiğindeki zincirlerle bağlantı kuran enzimlerin substratı olarak görev yapar. Bu enzimlerin önemi ise β -laktam antibiyotiklerinin hedefi olmalarıdır. Bağlantı kurulan peptidoglikan zincirleri ise hücre duvarını güçlendirme ve hücre lizisini önlemekle sorumludurlar (French, 2010 ve Wright, 2011).

1.5.2.3.1.1.2. *vanA* glikopeptid direnci

VanA direnç operonu yedi gen (*vanA*, *H*, *X*, *R*, *S*, *Y*, *Z*) tarafından oluşturulmaktadır. Kazanılmış *vanA* direnci 10,581 bp'lik Tn1546 transpozonu aracılığıyla gerçekleşmekte ve plazmid tarafından taşınabilmektedir. *VanA* geni vankomisin ve teikoplanine yüksek seviye transfer edilebilir direnç sağlar. *VanA*, *H*, *X*, *R*, *S*, *Y*, *Z* genlerinin eksprese olması, normalde D-Ala-D-Ala ile sonlanan peptidoglikan öncü maddelerinin D-Ala-D-Lac ile sonlanmasına neden olmaktadır. Böylece peptidoglikan sentezi normal olmayan bir şekilde gerçekleşmiş olmakta ve vankomisin D-Ala-D-Lac ile bağlanmaktadır. Vankomisin, D-Ala-D-Ala ve beş adet hidrojen bağı serisi birleşerek non-kovalent bir kompleks oluşturur. Direnç, D-Ala-D-Ala ile isosterik depsipeptid D-Alanin-D-Lac'ın yer değiştirmesinden kaynaklanır. D-Ala-D-Ala'nın amin grubu ile ester bağının yer değiştirmesi, *H* bağı vericisini elimine eder, elektronik itmeye neden olur ve antibiyotikle bağlanmayı önler (Çetinkaya ve ark., 2000; Fisher ve Phillips, 2009; French, 2010; Klare ve ark., 2003 ve Wright, 2011).

1.5.2.3.1.1.3. *vanB* glikopeptid direnci

VanB glikopeptid direnci, *vanA* ile yapısal benzerlik gösteren (% 76 aminoasit benzerliği) *vanB* ligaz tarafından oluşturulmaktadır. *VanB* proteini aynı zamanda D-Ala-D-Lac ile sona eren pentadepsipeptid üretiminden sorumlu tutulmaktadır. *VanA* direnciyle benzer olarak ilgili genler *vanH_B*, *X_B*, *Y_B*, *R_B*, *S_B* olarak adlandırılmaktadırlar. D,D-dipeptidaz aktivitesi (*vanX_B*) vankomisin direnç seviyelerini belirlemektedir. *VanY_B* tüm izolatlarda bulunmamakta ve Tn1546'da bulunan pozisyonu farklılık göstermektedir. DNA'daki sekans heterojenitesi, üç adet farklı *vanB* ligazın *vanB*-1, *vanB*-2 ve *vanB*-3 olmak üzere üç alt grubun olduğunu desteklemektedir. *VanB* izolatlarındaki düzenleyici sistemin, teikoplanin direncinin oluşumuna duyarsız olduğu belirtilmektedir. Teikoplanin, *vanA* ile ilişkili proteinlerin sentezini teşvik etmekte fakat *vanB* ile ilişkili proteinlerin üretimine neden olamamaktadır. Diğer bir taraftan, aslında her iki sistemde de, teikoplanine

duyarlı enterokok ile *vanB* gen kümesi vankomisine maruz kaldıysa teikoplanine karşı dirençlilik testi de yapılmalıdır (Çetinkaya ve ark., 2000).

VanA ve *vanB* tipi direnç arasındaki farklardan biri de, *vanA* tipi direncin Avrupa'da çok daha yaygın olduğudur. *vanB* tipi daha çok Amerika'dan izole edilmektedir. *VanA* ligaz geni enterokok türleri arasında daha yayginken, *vanB* öncelikli olarak *E. faecium* ve *E. faecalis*'ten izole edilmektedir. *VanB* gen kümesi konakçı kromozom üzerine lokalize olmakta fakat plazmid tarafından taşınabilmektedir (Çetinkaya ve ark., 2000; Fisher ve Phillips, 2009 ve Klare ve ark., 2003).

1.5.2.3.1.1.4. *vanC* glikopeptid direnci

Düşük düzeyde vankomisin direnci *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* için tipiktir. *E. gallinarum*'da *vanC*₁ geninin, *E. casseliflavus*'da *vanC*₂ geninin, *E. flavescens*'de ise *vanC*₃ geninin nükleotid sekansları bildirilmiştir. *E. gallinarum*'daki *vanC* ligaz, D-Ala-D-Ser ile sonlanan pentepeptidin üretiminden sorumludur. D-Ser ve D-Ala'nın yer değiştirmesinin, vankomisinin yeni pentapeptide bağlanmasını zorlaştırdığı öngörülmektedir. *VanC*₁'in inaktivasyonu, *E. gallinarum*'daki D-Ala-D-Ala pentapeptidinin üretimini ortaya çıkarmaktadır. D,D-peptidaz ve D,D-karboksipeptidaz aktiviteleri *vanA* ve *vanB*'dekilerle benzerlik göstermektedir. D-Ala-D-Ser'e göre değişen miktarlardaki D-Ala-D-Ala miktarları *vanC* fenotipi taşıyan VRE izolatlarındaki değişen seviyelerdeki vankomisin direncinden sorumludur. Yani, düşük miktarlardaki MIC değerleri yüksek miktardaki D-Ala-D-ala'nın varlığıyla; yüksek miktarlardaki MIC değerleri yüksek miktardaki D-Ala-D-ser'in varlığıyla açıklanabilmektedir. D-Ala-D-Ala vankomisinin hücre zarı sentezini inhibe etmesini sağlamaktadır. *E. casseliflavus*'un *vanC*₂ geni, *vanC*₁'dekiyle % 66 nükleotid sekans benzerliği göstermektedir. *E. gallinarum*'a benzer olarak ligaza sahiptirler. *VanC*₂ ve *vanC*₃ arasında ise % 98 oranında yüksek bir benzerlik bulunmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000; Fisher ve Phillips, 2009 ve Klare ve ark., 2003).

E. casseliflavus ve *E. gallinarum*'dan da *vanA* genleri identifiye edilmiştir ve bu izolatların vankomisine yüksek düzeyde direnç ($MIC > 26 \mu g/ml$) gösterdiği, aynı zamanda teikoplanine de dirençli oldukları belirlenmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000).

1.5.2.3.1.1.5. *vanD* glikopeptid direnci

VanD, vankomisin direnç geni ilk olarak 1991 yılında New York Hospital'dan identifiye edilmiştir. Bu geni taşıyan *E. faecium* izolatı, vankomisine karşı $64 \mu g/ml$, teikoplanine karşı $4 \mu g/ml$ direnç göstermekteydi. Ligaz geninin sekanslanmasıyla *vanA* ve *vanB* ligaz genleriyle benzerlik taşıdığı fakat bunlardan farklı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Boston'dan elde edilen diğer bir *E. faecium* izolatından ise *vanD*'nin aminoasit sekanslanmasında ise *vanA* ve *vanB*'ye % 67 benzerlik gösterdiği görülmüştür. *VanD*'nin kromozom üzerinde taşındığı ve diğer enterokoklara transfer edilemediği kaydedilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000).

1.5.2.3.1.1.6. *vanE* glikopeptid direnci

VanE vankomisin direnç geni *E. faecalis* BM4405'ten izole edilmiş ve vankomisine karşı düşük düzeyde ($MIC: 16 \mu g/ml$) direnç gösterdiği, teikoplanine ise duyarlı olduğu ($MIC: 0,5 \mu g/ml$) belirlenmiştir. Bu direnç genotipinin ise *vanC* tipi direnç ile benzerlikleri bulunmaktadır. Aminoasit sekanslamalarında *vanC*'ye % 55, *vanA*'ya % 45, *vanB*'ye % 43 ve *vanD*'ye % 44 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000). Enterokokların glikopeptid antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç mekanizmaları Çizelge 1.5'te verilmiştir (Fisher ve Phillips, 2009 ve Klare ve ark., 2003).

Çizelge 1.5. Enterokokların glikopeptid antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç mekanizmaları (Fisher ve Phillips, 2009 ve Klare ve ark., 2003).

Direnç genleri	Transfer edilebilen element	Fenotipik direnç faktörü	MIC değerleri	Direnç spektrumu
<i>vanA</i>	Tn1546	<i>vanA</i> : D-Ala-D-Lac	64-1000	Vankomisin, Teikoplanin, Avoparsin
<i>vanB</i>	Tn1547	<i>vanB</i> : D-Ala-D-Lac	4-1000	Vankomisin, Avoparsin
	Tn5382	<i>vanB</i> + PBP5	2-32	Vankomisin, Ampisilin
<i>vanC</i> ₁ (intrinsik)	-	<i>vanC</i> ₁ (<i>E. gallinarum</i>): D-Ala-D-Lac	2-32	Vankomisin, Teikoplanin
<i>vanC</i> _{2/3} (intrinsik)	-	<i>vanC</i> _{2/3} (<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i>): D-Ala-D-Ser	2-32	Vankomisin, Teikoplanin
<i>vanD</i>	?	<i>vanD</i> (<i>E. faecium</i>): D-Ala-D-Lac	64-168	Vankomisin, Teikoplanin
<i>vanE</i>	?	<i>vanE</i> (<i>E. faecalis</i>): D-Ala-D-Ser	16	Vankomisin, Teikoplanin
<i>vanG</i>	?	<i>vanG</i> (<i>E. faecalis</i>): D-Ala-D-Ser	<16	Vankomisin, Teikoplanin

1.5.2.4. Kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolononlar

Enterokokların kloramfenikol direnci, asetiltransferazlar (horizontal gen transferine sahip ve plazmidler tarafından kodlanan stafilokokal *cat* genleri) ve akış mekanizmasıyla ilişkilendirilmektedir. Tetrasiklinlere olan dirençleri ise ribozomal afiniteyi düşürücü etkiye sahip *tet* genleri ve akış mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Enterokoklardaki kinolonon direnci, *gyrA* (giraz) ve *parC* (topoizomera IV) genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Enterokokların kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolonon antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları Çizelge 1.6’da gösterilmektedir (Klare ve ark., 2003).

Çizelge 1.6. Enterokokların kloramfenikol, tetrasiklin ve kinolonon antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları (Klare ve ark., 2003).

Antibiyotik	Direnç mekanizması	Transfer edilebilir element	Direnç genleri	Direnç spektrumu
Kloramfenikol	Kloramfenikol asetiltransferaz	pIP501 plazmidi	<i>catIP501</i>	Kloramfenikol
	Kloramfenikol asetiltransferaz	pSCS7, pC194, pC221 plazmidleri	<i>catpSCS7</i> , <i>catpC194</i> , <i>catpC221</i>	Kloramfenikol
Tetrasiklinler	Akış (efflux)	-	<i>tet(K)</i>	Tetrasiklinler
	Akış (efflux)	Konjugatif plazmidler	<i>tet(L)</i>	Tetrasiklinler
	Ribozomal konformasyonun değişimi	Tn916	<i>tet(M)</i>	Tetrasiklin, minosiklin
		Konjugatif plazmidler	<i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i>	Tetrasiklin, minosiklin
	Bilinmiyor	Plazmid	<i>tet(U)</i> – <i>E. faecium</i>	Tetrasiklin, minosiklin
Kinolononlar	GyrA ve ParC genlerinde mutasyon	-	<i>gyrA</i> ve <i>parC</i>	Orta seviye (sadece <i>parC</i> 'de mutasyon)
	GyrA ve ParC genlerinde mutasyon	-	<i>gyrA</i> ve <i>parC</i>	Yüksek seviye (<i>gyrA</i> ve <i>parC</i> 'de mutasyon)

1.5.2.5. Daptomisin direnci

Daptomisin, in vitro olarak enterokoklara karşı bakteriyel aktivite gösteren lipopeptid yapıda bir antibiyotiktir. ABD ve diğer ülkelerde VRE infeksiyonlarının tedavisinde, bu olgularında kullanımı Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmamış olmasına rağmen kullanılmaktadır. Daptomisinin başarısını engelleyen en büyük sorun, bu antibiyotiğe karşı geliştirilen dirençtir (Arias ve Murray, 2012).

Daptomisin, bakteriyel hücre zarında hızlı depolarizasyona neden olarak hücre ölümüne sebep olmaktadır. Daptomisin aktivitesi için zorunlu olan olay hücre duvarı

ile kalsiyumun etkileşimidir. Daptomisin hücre zarından kalsiyuma bağlanarak geçer ve hücreden iyon sızıntısı olmasına neden olacak por oluşumunu sağlar. Bu etkileşim, daptomisinin insanların savunma mekanizmasının bir parçası olan katyonik antimikrobiyal peptidleri paylaştığı bir özelliğidir (Arias ve ark., 2011 ve Palmer ve ark., 2011).

Daptomisine direnç ve hassasiyet gösteren izolatların karşılaştırılması, dirençli olan izolatların hücre zarı ve hücre duvarında değişim gerçekleştiğini göstermiştir. Bu değişim daptomisinin, dirençli hücre zarını depolarize etmekte güçlük çekmesine neden olmaktadır. Pozitif olarak yüklenen hücre duvarı, hücre zarındaki katyonik daptomisini reddeder ve bu durum direnç gelişimine neden olur. Hücre duvarının yükünün değişimine neden olan temel faktör, negatif yüklü fosfolipid kardiyoipin ve pozitif yüklü fosfatidilgliserolün amino derivatları gibi hücrenin iç ve dış zarı yapılarındaki fosfolipid kompozisyonudur (Arias ve ark., 2011 ve Arias ve Murray, 2012).

Enterokoklarda daptomisine karşı direnç gelişiminin iki basamakta gerçekleştiği bildirilmektedir. Birinci basamakta, *liaF* geni ve LiaFSR sistemindeki diğer komponentlerin mutasyon sonucunda gerçekleşen LiaFSR üç komponentli düzenleyici sistemin başlangıç aktivasyonudur. Bu sistemin aktive olması, antibiyotikten kaynaklanacak hasarların azaltılmasında etkili olabilecek birçok genin transkripsiyonunun etkilenmesi ve hücre duvarı homeostazını etkilenmesine neden olmaktadır. İkinci basamakta ise, hücre zarındaki daha sonraki değişim olan fosfolipid metabolizmasındaki *GdpD* veya *Cls* gibi enzimlerin farklılaşması gerçekleşir. Bu durum, hücre zarındaki fosfolipidlerin kompozisyon veya dağılımında kritik ve zorunlu değişimlerin meydana gelmesine neden olur. Bakteriyal *GdpD*, gliserol metabolizmasında önemli rolü oynar. Bu rolünü birçok hücre zarı gliserofosfodiesterlerini hidrolize ederek göstermektedir. Kardiyoipinin ise bakteriyal hücre bölünmesi ve hücre zarı fosfolipid kompozisyonlarındaki değişimleri tetikleme gibi hücre zarı fizyolojisinde birçok anahtar role sahip olduğu bilinmektedir (Arias ve ark., 2011 ve Arias ve Murray, 2012).

1.5.2.6. MLS antibiyotikleri (makrolidler, linkozamidler ve streptogramin)

Makrolid, linkozamid ve B tipi streptogramin antibiyotiklerine karşı direnç; *erm*(B) geni, asetiltransferaz enzimi ya da akış (efflux) pompası mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca bu gruptaki antibiyotikler aynı zamanda geçmişte büyüme faktörü olarak kullanılan ticari preparatlarla (spiramisin, tilosin, virginiamisin S/M) da yapısal benzerlik göstermektedir (Klare ve ark., 2003).

Kinupristin-dalfopristin, VRE kaynaklı infeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanan ilk antibiyotiktir ve 2000 yılına kadar Avrupa’da Gram pozitif infeksiyonlarda son çare olarak kullanılmıştır. Bu antibiyotik iki yarısentetik streptograminin karışımından oluşmaktadır (Arias ve Murray, 2012).

Virginiamisin S/M ise streptogramin A/B kombinasyonu olan kinupristin-dalfopristin ile çapraz direnç neden olmaktadır. Bu nedenle hayvan yetiştiriciliğinde virginiamisin S/M’nin kullanımı, kinupristin-dalfopristinlere dirençli bakterilerin oluşmasında etkili olmuştur (Klare ve ark., 2003).

Kinupristin-dalfopristin, 50S ribozomal alt üniteyi etkileyerek protein sentezini inhibe etmektedir. *E. faecalis* türlerinin kinupristin-dalfopristin direnci, bir ATP-bağlayıcı protein olan *lsa* aktivitesinden kaynaklanmaktadır. *E. faecium* türleri ise kinupristin-dalfopristin aktivitesini azaltıcı birçok mekanizmaya sahiptir. Bunlar; etkenin modifikasyonu, inaktivasyonu, virginiamisin asetiltransferaz (*vat*) ve virginiamisin B liyaz (*vgb*) aracılığıyla gerçekleşen akış (efflux), makrolid-streptogramin direnç proteini (*msrC*)’dir. (Virginiamisin kinupristin-dalfopristin ile benzerlik gösteren bir diğer streptogramin karışımıdır.) *erm* genlerinin ürettiği enzimler, 23S rRNA’nın değişmesine ve makrolid, linkozamid, kinupristine karşı direnç gelişimine neden olmaktadır (Arias ve Murray, 2012). Ayrıca *E. faecalis* türlerinin streptograminlere intrinsik olarak da direnç gösterdiği bildirilmektedir. Enterokokların MLS antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç mekanizmaları Çizelge 1.7’de gösterilmektedir (Klare ve ark., 2003).

Çizelge 1.7. Enterokokların MLS antibiyotiklerine geliştirdikleri direnç mekanizmaları (Klare ve ark., 2003).

Antibiyotik	Transfer edilebilen	Direnç genleri	Direnç spektrumu
Makrolidler	Tn917	<i>erm</i> (B), <i>erm</i> (A)	Eritromisin, Azitromisin, Klaritromisin
	-	<i>mef</i> (A)	Eritromisin, Azitromisin, Klaritromisin
	-	<i>msrC</i>	Makrolid, Linkozamid, Streptogramin B
Linkozamidler	-	<i>lnu</i> (B)	Linkomisin ve Klindamisin
Streptograminler	-	(<i>E. faecalis</i> - <i>lsa</i> intrinsik direnç)	Linkosamidler, Streptogramin A, Streptogramin A/B
	-	(<i>E. faecalis</i> - <i>vat</i> (E) intrinsik direnç)	Streptogramin A
	Plazmid	<i>E. faecium</i> <i>vat</i> (D)	Streptogramin A, Kinupristin-Dalfopristin, Virginamisin S/M
	[<i>vat</i> (D)+	<i>E. faecium</i> <i>vat</i> (E)	Streptogramin A, Kinupristin-Dalfopristin, Virginamisin S/M
	<i>vanA</i> +	<i>E. faecium</i> <i>vat</i> (A)	Streptogramin A, Kinupristin-Dalfopristin
	<i>erm</i> (B)]	<i>E. faecium</i> <i>erm</i> (B)	Streptogramin B, Kinupristin-Dalfopristin, Virginamisin S/M
		<i>E. faecium</i> <i>vgb</i> (A)	Streptogramin A, Kinupristin-Dalfopristin, Virginamisin S/M

1.5.2.7. Oksasolidinonlar ve everninomisinler

Klinik kullanımı 2000 yılında onaylanmış olan oksazolidinonların ilk üyesi olan linezolidler, VRE infeksiyonlarının tedavisinde kullanımına FDA tarafından onaylanan iki antibiyotikten biri olmakla birlikte çoklu antibiyotik direncine sahip stafilokok ve enterokok infeksiyonların büyük çoğunluğunda etkili olmaktadır. Fakat linezolidlerin uzun süreli tedavilerde kullanılması dirençli türlerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Linezolidlere dirençli enterokok salgını ilk kez İspanya’da ortaya çıkmış ve linezolid direncinden sorumlu enterokok türü *E. faecalis* olarak belirlenmiştir. Tüm dirençli izolatlarda MIC >128 µg/ml olarak kaydedilmiş ve duyarlılık noktasının ise 4 µg/ml olduğu belirtilmiştir (Gómez-Gil ve ark., 2009; Klare ve ark., 2003).

Linezolidler bakteriostatik etkilidir ve bakteriyal ribozomdaki A bölümü üzerindeki aminoasil tRNA'nın lokalizasyonuna etki ederek protein sentezini inhibe ederler. Bu direncin enterokoklardaki mekanizması, 23S rRNA'daki V alanı tarafından kodlanan genlerdeki G2576T mutasyonları ile ilişkilendirilmektedir. Bu mutasyon linezolid bağlanma bölümündeki nükleotidlerin konumlanmasını engellemektedir. *E. faecium* ve *E. faecalis* sırasıyla 6 ve 4 rRNA gen kopyalarına sahiptirler. Direncin seviyesi de mutasyona uğrayan allel genlerle bağlantılıdır. Gen kopyalarının aynı zamanda hücre içi rekombinasyonu mutasyona uğrayan rRNA genlerinin amplifikasyonunda rol oynadığı bildirilmektedir. Rekombinaz A eksikliği olan bakterilerde bu amplifikasyonun geciktiği gözlemlenmiştir (Arias ve Murray, 2012).

Everninomisinler, çoklu antibiyotik direncine sahip enterokoklar için alternatif bir tedavi seçeneği olarak düşünülmüş fakat klinik vakalarda yan etkilere neden olmaları gerekçesiyle kullanımları durdurulmuştur. Aynı zamanda, bu sınıf antibiyotikleri içinde yer alan avilamisin de geçmişte hayvan yetiştiriciliğinde büyüme faktörü olarak kullanılmaktaydı. Avilamisin ve evernimisin arasındaki çapraz direncin oluşumu, evernisinin enterokok infeksiyonları üzerindeki etkinliğini negatif yönde etkilediği bildirilmektedir. Enterokokların oksazolidinon ve everninomisin antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları Çizelge 1.8'de gösterilmektedir (Klare ve ark., 2003).

Çizelge 1.8. Enterokokların oksazolidinon ve everninomisinantibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları (Klare ve ark., 2003).

Antibiyotik	Direnç mekanizması	Direnç genleri	Direnç spektrumu
Oksazolidinonlar	Nükleotid 2576'daki 23S rRNA'nın V bölgesi	G2576T	Linezolid
Everninomisinler	rRNA metiltransferazın 23S rRNA'daki G2470'i metillemesi	<i>emtA</i>	Everninomisin, Avilamisin

1.6. Gıdalarda antibiyotiklere dirençli enterokoklar

Enterokoklar insan ve hayvanların intestinal sistemlerinde doğal olarak bulunan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, yüksek derecede çoklu antibiyotik direncine de sahiptirler. Gıdalarda enterokoklar fekal kontaminasyonun indikatörleri olarak bilinmektedir. Enterokokların hayvanlardan insanlara ve patojen mikroorganizmalara kazanılmış direnç genlerini gıdalar aracılığıyla transfer edebildiği bildirilmektedir (Erol, 2007 ve Teuber, 2001).

Enterokokların düşük pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olmalarının yanı sıra yüksek enzimatik aktiviteleri nedeniyle süt ürünleri teknolojisinde starter veya ek starter olarak kullanılabilecekleri bildirilmektedir. Ancak starter kültür olarak kullanılacak enterokok türlerinin belirlenmesinde, suşun patojen olmaması ve antibiyotik dirençliliğinin olmamasına dikkat edilmelidir (Göncüoğlu ve ark., 2009).

Süt ürünlerinde starter kültür olarak kullanılmasının yanında birçok fermente et ürününde olgunlaştırma, aroma gelişimi ve antimikrobiyel etkinliği sağlamak için de kullanılmaktadır. Fermente gıdalarda en sık rastlanan türün *E. faecalis*, fermente olmayan gıdalarda ise *E. faecium* olduğu bildirilmiştir (Abouelnaga ve ark., 2016 ve Barbosa ve ark., 2010).

Bazı enterokokal kültürlerin ise peynir ve etlerde bakteriyosin üretiminde kullanıldıkları bildirilmiştir. Enterokoklar probiyotik olarak da bağırsağın mikrobiyel dengesini sağlamak, insan ve hayvanlarda gastroenteritis tablosunu desteklemek için kullanım alanı bulmaktadırlar. Probiyotik olarak kullanılmalarının nedeni ise gastrointestinal sistemdeki diğer mikroorganizmalar ile savaşabilmeleri ve hayatta kalabilmeleridir (Barbosa ve ark., 2010; Mannu ve ark., 2003 ve Vankerckhoven ve ark., 2008).

Diğer yandan, tavuk eti, patojen mikroorganizmaların rahatlıkla üreyebileceği ve gelişimlerini sürdürebilecekleri oldukça uygun bir ortamdır. Gıdadan kaynaklanan infeksiyonların yanı sıra tavuk etlerinin bozulması açısından da oldukça önemlidir. Enterokoklar tuz, pH ve sıcaklığa karşı dirençleri dolayısıyla işlem görmüş gıdalarda bozulmalara sebep olmaktadır. Yeterli ısı işlemine tabi tutulmadıklarında *Enterococcus* spp. ile kontamine hayvansal gıdalar insanların gastrointestinal kanalında infeksiyonlara neden olmaktadır (Kročko ve ark., 2007). Dünya genelinde yürütülen araştırmalarda, tavuk etinin insanlarda nozokomiyal infeksiyonlara yol açan VRE için önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu bilinmektedir (Philips ve ark., 2004).

Antibiyotik dirençli enterokoklar (ARE)'in varlığı et ve süt ürünleri, tüketime hazır gıdalar ve probiyotik olarak kullanılan gıdalarda dahi bildirilmektedir. Avrupa'da üretilen peynirlerden izole edilen ve başlıca *E. faecalis* ve *E. faecium*'a ait olan izolatların değişen miktarlarda penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, linkomisin, rifampisin, fusidik asit ve vankomisine dirençli oldukları belirtilmiş, ayrıca çoklu antibiyotik direnç prevalansları belirlenmiştir (Giraffa, 2002).

Antibiyotik dirençli enterokoklar, hayvansal gıdalarla beslenen insanlardan kaynaklı fekal kontaminasyon, çevre ve hayvanlar vasıtasıyla yaygınlaşmaktadır (Bertrand ve ark., 2000). Gıdalarla ilişkilendirilen enterokoklar antibiyotik direncinin rezervuarlarıdır. ARE mideye girdiğinde mide pasajını geçebilmekte ve çoğalabilmekte, intestinal sistemde sürekli taşınmaktadır (Sorensen ve ark., 2001). Nozokomiyal infeksiyonlarda ARE'nin ortaya çıkışı, bu mikroorganizmaların potansiyel gıda rezervuarları olmaları, çevreye antibiyotik direncini yayması, insan sağlığı için risk oluşturmalarının bir sonucudur (Giraffa, 2002).

Antibiyotiklere dirençli enterokoklar (*E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. durans*) gıdalardan izole edilmektedir. 135 sosis ve peynir numunesi üzerinde yapılan bir çalışmada, örneklerde 10^2 - 10^7 kob/g enterokok bulunduğu ve *E. faecalis* izolatlarının kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin direncinin dominant olduğu,

E. faecium izolatlarının ise ampicilin, siprofloksasin, eritromisin, imipenem, nitrofurantoin, penisilin ve tetrasiline direnç gösterdiği bildirilmiştir (Teuber, 2001).

Enterokoklar peynir, fermente et ürünleri ve salamura sebzeler gibi birçok fermente üründe de bulunmaktadır. Çiğ süttten üretilen geleneksel peynirler esas olarak fermentasyona bağlı olarak oluşurken, aynı zamanda starter olmayan mikroorganizmalar tarafından olgunlaştırılırlar ve bu da aroma gelişimini sağlamaktadır (Mannu ve ark., 2003)

Yapılan bir çalışmada, peynirlerde ve fermente et ürünlerinde izole edilen enterokokların % 71'inin tetrasikline direnç gösterdiği belirlenmiştir (Teuber, 2001).

Enterokoklar geleneksel fermente ürünler ve birçok gıdadan kolayca izole edilebilmektedir. Bunun nedeni ise enterokokların memelilerin gastrointestinal sistemlerinde bulunmasıdır. Ayrıca çevresel faktörlere dirençli olduğundan toprak, yüzey suları, sebze ve meyvelerde de bulunabilmektedirler. İntestinal veya çevresel kontaminasyonla, enterokoklar çiğ et ve sütte kolonize olabilmekte ve fermentasyon sırasında çoğalabilmektedirler. Ayrıca ürünün işlenmesi sırasında son ürünü kontamine edebilmektedirler. Sonuç olarak birçok fermente et ürünü ve peynirlerde enterokoklara rastlanabilmektedir (Giraffa, 2002).

1.6.1. Süt ürünlerinde antibiyotiklere dirençli enterokoklar

Süt ürünlerinde enterokokların varlığı üretim ve işlem sürecinde hijyenin olduğunun göstergesidir. Bu durumun tersine, bazı enterokokların peynirin olgunlaşma sürecinde aroma gelişimine katkıda bulunduğu görülmüş ve bu yararlı etki enterokokların starter kültür olarak kullanımını gündeme getirmiştir (Giraffa, 2002).

Isıya karşı relatif dirençli olan enterokoklar, birçok peynirde özellikle geleneksel ev yapımı peynirlerde bulunmaktadır. Enterokokların peynirlerde

bulunması, sıcaklık uygulamasının ardından rekontaminasyondan ya da mikroorganizmanın sıcaklık, pH ve tuza karşı olan toleransından kaynaklanmaktadır. Peynirlerde olgunlaşma sonunda 10^5 - 10^7 kob/g kadar enterokok bulunduğu saptanmıştır (Erol, 2007 ve Giraffa, 2002).

Çiğ süttten yapılmış peynirlerde antibiyotik direncinin gıda zinciriyle yayılma riski diğer peynirlere göre daha fazladır. Fransa'da çiğ süttten yapılan peynirlerde ve hastanede yatan hastalarda kanamisin ve gentamisine karşı yüksek seviye direnç saptanmıştır (Bertrand ve ark., 2000).

Avrupa'da üretilen ev yapımı peynirlerin mikroflorasının büyük bir bölümünü oluşturduğu belirtilen enterokokların, peynirlerin olgunlaşması ve aroma gelişiminde etkin rolü olduğu belirtilmektedir. *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının peynir üretimi için starter kültür olarak seçildiği deneysel bir çalışmada, bu türlerin antibiyotik dirençleri de araştırılmıştır. *E. faecalis* izolatlarının yalnızca 1'i dışında hepsi vankomisine karşı direnç göstermiştir. *E. faecium* izolatları ise en fazla direnci % 56,3 ile siprofloksasine, % 45,8 penisiline, % 27,1 eritromisine, % 10,4 kloramfenikole, % 6,3 tetrasikline, % 4,2 streptomisine, % 2,1 gentamisine, % 2,1 vankomisine karşı göstermiş, izolatlardan hiçbirisi ampisiline karşı direnç göstermemiştir. Buna karşın *E. faecalis* izolatları % 63,8 kloramfenikole, % 46,8 streptomisine, % 44,7 tetrasikline, % 31,9 eritromisine, % 27,7 siprofloksasine, % 25,5 gentamisine, % 12,8 penisiline, % 2,1 ampisiline karşı direnç göstermiş, izolatlardan hiç biri vankomisine direnç göstermemiştir. Tüm antibiyotiklere karşı direnç gösteren izolata rastlanmamış fakat beş ve daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direncine sahip izolatlar gözlenmiştir (Franz ve ark., 2001).

1.6.2. Et ürünlerinde antibiyotiklere dirençli enterokoklar

Et ve et ürünleri patojen mikroorganizmaların rahatlıkla üreyebileceği ve gelişimlerini sürdürebilecekleri oldukça uygun bir ortamdır. Gıdadan kaynaklanan infeksiyonların yanı sıra tavuk etlerinin bozulması açısından da oldukça önemlidir.

Enterokoklar tuz, pH ve sıcaklığa karşı dirençleri dolayısıyla işlem görmüş gıdalarda bozulmalara sebep olmaktadır. Yeterli ısı işlemine tabi tutulmadıklarında *Enterococcus* spp. ile kontamine hayvansal gıdalar insanların gastrointestinal kanalında infeksiyonlara neden olmaktadır (Kročko ve ark., 2007). Dünya genelinde yürütülen araştırmalarda, tavuk etinin insanlarda nozokomiyal infeksiyonlara yol açan VRE için önemli bir kontaminasyon kaynağı olduğu bilinmektedir (Philips ve ark., 2004).

Enterokokların sıcaklık işlemine karşı olan dirençlilik durumları; bakteri kültürünün yapısı, ortamın besin içeriği, yağ asidi miktarı, pH'sı ve membran yapısı gibi birçok etkene bağlıdır. Mikroorganizmaların gelişimini sürdürebildikleri ve üreyebildikleri en düşük sıcaklıklarda membran yapısı sabittir. Yüksek sıcaklık derecelerinde ise doymuş yağ asidi miktarının düşmesi ve membran yağ asidi konsantrasyonunun artması, enterokokları yüksek sıcaklığa minimum dirençli duruma getirmektedir (Ahmad ve ark., 2002 ve Ivanov ve ark., 1999).

Fermente et ürünleri dünyanın birçok yerinde ve geniş çeşitlilikte üretilmektedir. Avrupa'da yaygın olan ürünler arasında İtalyan salamı, Alman sosisleri ve bunların birçok çeşidi yer almaktadır. Bu ürünlerin üretimi için gerekli olan teknoloji büyük ölçüde birbirlerine benzemektedir. Son ürünün stabilizasyonu için yapılan fermentasyon periyodundan sonra, işlenmiş ürünler tuzlanma veya dumanlamaya tabi tutulurlar ve büyük ölçüde çiğ olarak tüketilirler. Çiğ kırmızı ette $10^2 - 10^4$ kob/g bulunan enterokoklar sıcaklık, pH ve tuzlamaya karşı oldukça dirençli olduklarından, işlenmiş ürünlerde hızla çoğalarak bozulmaya neden olurlar. Bu nedenle, ürünlerin işlenmesi sırasında uygun sıcaklık uygulamasının yapılması önemlidir (Giraffa, 2002).

Yapılan bir çalışmada, parça domuz etlerinden elde edilen *E. faecium* izolatlarının vankomisin, teikoplanin, avoparsin, penisilin, ampisilin, streptomisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve siprofloksasine dirençli olduğu belirlenmiştir (Teuber ve ark., 1999).

Birçok olguda enterokoklar sıcaklık uygulamasına dayanıklı olduklarından, özellikle başlangıç mikroorganizma sayısı yüksek olduğu durumlarda, pişmiş ve işlem görmüş et ürünlerinde de bozulmaya neden oldukları bildirilmektedir. Bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda normal bir frankfurter üretiminde kullanılan 68 °C'de 30 dakika ısı işleminde *E. faecium*'un canlılığını koruyabildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, enterokokların varlığının fermente ve fermente olmayan et ürünlerinde günümüzde kullanılan teknolojilerle önlenemediği görülmektedir (Giraffa, 2002).

İsviçre ve Danimarka'da tavuklardan elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarından sırasıyla % 73'ü ve % 55'i tetrasiklin, eritromisin ve vankomisin antibiyotiklerinden birine veya birkaçına karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir. Kıyma, sosis, jambon ve bifteklerden izole edilen enterokokların basitrasin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, penisilin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin antibiyotiklerinden birine veya birkaçına karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir. Çiftlik hayvanlarının etlerinden izole edilen enterokokların çoklu antibiyotik direncinin % 60-100 arasında olduğu bildirilmektedir (Giraffa, 2002).

Yüksek seviye vankomisin direncine sahip enterokoklar özellikle *E. faecium*, biftek, kanatlı ürünleri, domuz eti, et ürünleri ve peynirlerde yüksek oranda bulunmaktadır. VanA tipi glikopeptid direnci (vankomisin ve teikoplanine direnç) gıdalarla ilişkilendirilen VRE vakalarında en sık rastlanan direnç fenotipi olarak bilinmektedir (Giraffa, 2002). Çeşitli gıdalardan izole edilen antibiyotik dirençli enterokoklar Çizelge 1.9'da gösterilmektedir (Werner ve ark., 2013).

Çizelge 1.9. Çeşitli gıdalardan izole edilen antibiyotik dirençli enterokoklar (Werner ve ark., 2013).

Gıda	MLS _B	Tetrasiklinler	Aminoglikozitler	Glikopeptidler
Fransız peynirleri	<i>ermB</i>	<i>tetM</i> , <i>tetL</i>	<i>aac6'</i> - <i>aph2''</i> , <i>aph3''</i>	-
İsviçre peynirleri	<i>ermB</i>	<i>tetM</i> , <i>tetL</i>	ND	ND
Kanath ürünleri	<i>ermB</i>	-	<i>aac(6')</i> - <i>Ie-aph(2'')</i> -	<i>vanA</i> , <i>vanC1</i>
Broyler ve domuz eti	<i>ermB</i>	<i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i>	<i>aac6'</i> - <i>aph2''</i> ,	<i>vanA</i>
Broyler	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermAM</i> , <i>msrC</i> , <i>vat(E)</i> , <i>linB</i>	<i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i>	<i>Aac</i> , <i>aacA-aphD</i> , <i>aadB</i> , <i>aphA</i> , <i>sat4</i>	
Sosisler	<i>ermB</i>	<i>tetM</i>	<i>aac(6')</i> - <i>Ie-aph(2'')</i>	<i>vanA</i>
Parça et (domuz, tavuk, hindi)	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>vat(E)</i> , <i>linB</i>	<i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i>	<i>Aac</i> , <i>aphA3</i> , <i>aadE</i>	
Broyler üretim hattı	<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>msrC</i> , <i>vgaA</i> , <i>vat(D)</i> , <i>vat(E)</i>	ND	ND	ND

ND: saptanamamıştır

1.7. Enterokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Enterokokal infeksiyonlar sıklıkla bakteriyemi, endokarditis, intra-abdominal ve pelvik infeksiyonlar, üriner sistem, sentral sinir sistemi ve deri infeksiyonlarına neden olmakta, daha az olarak da osteomyelit, septik artritis ve yumuşak doku apselerinden izole edilmektedir (DiazGranados ve ark., 2005; Guerrero ve ark., 2007; Harbarth ve Uckay, 2004; O'Driscoll ve Crank, 2015; Salgado, 2008; Sievert ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014).

1.8. Enterokokal infeksiyonların sağaltımı

Enterokokal infeksiyonların tedavisi amacıyla gerekli antibiyogram testleri yapıldıktan sonra antibiyotik direncin gelişip gelişmemesine bağlı olarak hareket edilmelidir. Vankomisin direncine sahip enterokok infeksiyonların sağaltımı halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. VRE infeksiyonlarının tedavisi için son yıllarda VRE'ye karşı linezoliden dört kat daha düşük MIC değerine sahip gelecek nesil bir

antibiyotik olan tedizolidin parenteral veya oral yolla kullanımı *vanA* ve *vanB* direncine sahip VRE infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Tedizolid, *cfr* genindeki mutasyonla linezolid dirençli izolatlar karşı etkinlik göstermektedir (Brown ve Traczewski, 2010 ve Rybak ve ark., 2014).

VRE infeksiyonlarının tedavisi için tigesiklin kullanımı bir başka alternatiftir. Minosiklin derivatı olan ve FDA tarafından onaylanan ilk *glisilsiklin* antibiyotiktir. Bu güne kadar VRE izolatlarında tigesiklin direnci belirtilmemiştir. Telavansin, dalbavansin ve orivansin VRE infeksiyonlarında kullanılabilecek lipoglikopeptid antibiyotiklerdir. Telavansin ve dalbavansin sadece *vanB* direncine sahip VRE infeksiyonlarında etkili iken, orivansin *vanA* ve *vanB* direncine sahip VRE infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilmektedir (Stein ve Craig, 2006; O'Driscoll ve Crank, 2015).

Ampisilin ve vankomisin direncine sahip enterokokal infeksiyonların tedavisinde nitrofurantoin ve fosfomisin antibiyotikleri kullanılabilmektedir (Zhanel ve ark., 2001; Shrestha ve ark., 2003).

1.9. Yasal Düzenlemeler

Avrupa Birliği'nde 2006 yılı itibariyle antibiyotik büyüme faktörleri tümüyle yasaklanmıştır. Türkiye'de ise 2002 yılında yayınlanan ilgili tebliğ kararınca antibiyotik büyüme faktörlerinin tümünün kullanımları 2006 yılı itibariyle yasaklanmıştır (Anon, 2002).

Avrupa Birliği 1998 yılında 'Avoparsin, tilosin fosfat, virginamisin, spiramisin, zinc basitrasin' in yem katkısı olarak kullanılmasını yasaklamıştır. Danimarka, Finlandiya, İsveç ülkelerinde ise bu antibiyotiklerin yem katkısı ve büyüme faktörü olarak kullanılması yasaklanmıştır (Anon, 1998).

Dünya çapında gerek nozokomiyal gerekse gıda kaynaklı infeksiyonlarda önem arz eden *Enterococcus* spp.'lerin Türkiye'deki tavuk etlerindeki durumunun belirlenmesi, gıda güvenliği ve halk sağlığı boyutu ile ilgili bilimsel veri sağlanması, aynı zamanda vankomisin dirençli enterokokların tavuk etlerinde kontrolüne yönelik uygulamalara temel teşkil etmesi amaçlanmaktadır. Elde edilen epidemiyolojik veriler halk sağlığının korunmasına hizmet edecektir.

Çalışma verileri Türkiye'de klinik izolatlarda nozokomiyal infeksiyonlara neden olan vankomisin dirençli *Enterococcus* spp. izolasyon ve identifikasyonu üzerine yapılan çalışmaların yanı sıra tavuk etlerinde vankomisin dirençli enterokokların varlığını araştıran az sayıdaki çalışmalara katkıda bulunarak bunlardan kaynaklanan infeksiyonların önüne geçebilmek için gerekli önlemlerin alınmasını sağlayacaktır. İzolatların PCR metodu ile tiplendirilmelerinin yapılması ile elde edilen vankomisin dirençli suşların potansiyel insan izolatları ile karşılaştırılması moleküler epidemiyolojik çalışmalarda önemli bir veri olarak önem taşımaktadır. Özellikle hastane infeksiyonları açısından önem taşıyan vankomisin dirençli enterokoklarla kontamine olmuş tavuk etlerinde varlığının ortaya çıkarılmasıyla multidisipliner bir çalışma ortamı oluşturularak oluşabilecek infeksiyonları önlemek için ulusal kalıntı izleme programları ile kontrol stratejilerine katkıda bulunması amaçlanmaktadır.

Bu amaçla çalışmada, Ankara'da farklı marketlerde satılan tavuk kuşbaşı örneklerinden *Enterococcus* spp. izolasyonu ve identifikasyonu yapılmış, izolatlar PCR analizi ile doğrulanmış, pozitif örnekler multipleks PCR yöntemiyle identifiye edilmiştir. Çalışmada tespit edilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* izolatlarının Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) standartlarına göre vankomisin, eritromisin, kinupristin-dalfopristin, kloramfenikol, streptomisin, gentamisin, penisilin, linezolid antibiyotiklerine karşı direnç profilleri tespit edilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak identifiye edilen türler *vanA* ve *vanB* direnç fenotipleri yönünden multipleks PCR analizi yapılarak moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Vankomisine direnç ve orta düzeyde dirençli tüm suşlarda MİK değerleri belirlenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Çalışmada materyal olarak Ankara ilinde farklı marketlerde taze olarak tüketiciye sunulan toplam 120 kuşbaşı tavuk örneği kullanılmıştır. Örnekler Eylül, Ekim, Kasım, Aralık, Ocak, Şubat ve Mart aylarında farklı markalardan orijinal paketinde ve 14 farklı açıkta dökme noktasından olmak üzere toplam 28 farklı satış noktasından toplanmıştır. Örnekler iki saat içerisinde soğuk zincirde laboratuvara getirilerek analizleri yapılmıştır.

2.1.1. *Enterococcus* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su

Bileşimi: 10 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 9.0 g/L Na₂HPO₄.12H₂O, 1,5 g/L K₂HPO₄

pH (25°C): 7,2 ± 0,2

Hazırlanması: Klasik kültür yöntemi kullanılarak, dehidre besiyeri 25,5 g/L olacak şekilde sıcak su banyosunda eritildi, pH değeri ayarlandıktan sonra 16x150 mm'lik tüplere dokuzar ml paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkan besiyerleri oda sıcaklığına ulaştığında buzdolabı koşullarında muhafaza edildi.

2.1.1.2. Slanetz-Bartley Agar (Oxoid, CM0377A)

Bileşimi: 20 g/L Triptoz, 5 g/L Maya ekstraktı, 2 g/L Glikoz, 4 g/L Di-potasyum hidrojen fosfat, 0,4 g/L Sodyum azid, 0,1 g/L Tetrazolyum klorit, 10 g/L Agar

pH (25°C): $7,2 \pm 0,2$

Hazırlanması: Dehidre besiyeri, 41,5 g/L olacak şekilde hazırlanarak, pH değerinin uygunluğu kontrol edildikten sonra sıcak su banyosunda eritildi. Besiyeri şeffaf ve homojen hale geldikten sonra ısısı 45-50 °C'ye düşürülene kadar soğutuldu ve sterilpetrilere paylaştırıldı. Besiyerlerinin 12 saat oda sıcaklığında bekletilmesinin ardından buzdolabı koşullarında muhafazası gerçekleştirildi.

2.1.1.3. % 0,6 Maya Ekstraktı İçeren Tryptone Soya Agar (TSA)

Tryptone Soya Agar, TSA (Oxoid, CM0131)

Bileşimi: 15 g/L Pankreatik kazein, 5 g/L Enzimatik soya fasülyesi, 5 g/L Sodyum klorit, 15 g/L Agar

pH (25°C): 7.3 ± 0.2

Yeast Extract Agar (Oxoid, LP0021B)

Bileşimi: 3 g/L Maya ekstraktı, 5 g/L Pepton, 15 g/L Agar

pH (25°C): $7,2 \pm 0,2$

Hazırlanması: Çalışmada elde edilen izolatların muhafazası amacıyla kullanılacak bu besiyerini hazırlamak için, Tryptone Soya Agar dehidre besiyerinden 40 gram ve Yeast Extract Agar besiyerinden altı gram tartılarak bir litre distile suda çözündürüldü, pH değeri de düzenlenerek sıcak su banyosunda eritildi. Eritilen besiyeri dokuzar ml olacak şekilde tüplere paylaştırılarak otoklavda sterilize edildi. Sterilize olan tüpler otoklavdan alındıktan sonra yatık bir pozisyona getirilerek yaklaşık 12 saat oda

sıcaklığında katılaşması için bekletildi. Katılaştıran besiyerlerinin muhafaza işlemi için buzdolabı koşulları kullanıldı.

2.1.1.4. Brain Heart Infusion Broth (Oxoid, CM1135B)

Bileşimi: 12,5 g/L Beyin infüzyon katı maddeleri, 5 g/L Sığır eti ve kalbiinfüzyon katı maddeleri, 10 g/L Proteoz pepton, 2 g/L Glikoz, 5 g/L Sodyum klorit, 2,5 g/L Di-sodyum fosfat

pH (25°C): $7,4 \pm 0,2$

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 37 g/L olacak şekilde hazırlanarak pH değeri kontrol edildi ve sıcak su banyosunda eritildi. Eritilen besiyeri 9'ar ml, 16x150 mm'lik tüplere alınarak otoklavda 15 dakika, 121 °C'de sterilize edildi. Tüpler otoklavdan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve daha sonra muhafazası için +4 °C'ye alındı.

2.1.2. *Enterococcus* spp. İdentifikasyonu Amacıyla Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

2.1.2.1. Hidrojen Peroksit

H₂O₂ (Merck, 1.08597.1000), % 30'luk

Hazırlanması: İzolatların katalaz aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılacak bu test için gerekli olan % 3'lük H₂O₂ solüsyonunu hazırlamak amacıyla, 27 ml distile su içine % 30'luk H₂O₂'den üç ml ilave edildi. Solüsyon sadece testin yapılacağı gün kullanılmak üzere taze olarak hazırlandı.

2.1.2.2. % 6,5'lik NaCl içeren MRS Agar

- MRS Agar (de Mann Rogosa Sharpe Agar, Oxoid, CM0359B)

Bileşimi: 10 g/L Pepton, 8 g/L Lab-Lemco' tozu, 4 g/L Maya ekstraktı, 20 g/L Glikoz, 1 ml Sorbitan mono-oleat, 2 g/L Di-potasyum hidrojen fosfat, 5 g/L Sodyum asetat 3H₂O, 2 g/L Triamonyum sitrat, 0,2 g/L Magnezyum sülfat 7H₂O, 0,05 g/L Manganez sülfat 4H₂O

pH (25°C): 6,2 ± 0,2

- NaCl (Oxoid/Remel, LP 005 B)

- AnaeroGen Gaz Kitleri (Oxoid, AN 0025 A; AN 0035 a)

Hazırlanması: Bir litre distile su içerisinde, dehidre besiyerinden 62 g ve NaCl'den 65 g tartılarak çözündürüldü ve pH'sı N/10'luk NaOH ile 9,6'ya ayarlandıktan sonra sıcak su banyosunda eritildi. Hazırlanan bu besiyeri 15 dakika, 121 °C'de otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyon işleminden sonra otoklavdan alınan besiyeri 45-50 °C'ye soğutulup 12-13'er ml olacak şekilde steril petrilere paylaştırıldı. Isının biraz daha düşmesi için yaklaşık 12 saat oda sıcaklığında bekletilen besiyerleri muhafaza edilmek üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

İnkübasyonun anaerob koşullarda yapılabilmesi amacıyla AnaeroGen Gaz Kitleri kullanıldı.

2.1.2.3. SulphideIndole Motility Medium (SIM Medium, Oxoid, CM0435B)

Bileşimi: 20 g/L Tripton, 6,1 g/L Pepton, 0,2 g/L Ferröz amonyum sülfat, 0,2 g/L Sodyum triosülfat, 3,5 g/L Agar

pH (25°C): 7,3 ± 0,2

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 30 g/L olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü ve pH uygun değerde sabitlendikten sonra sıcak su banyosunda eritildi. Hazırlanan besiyeri dokuzar ml, 16x150 mm'lik tüplere paylaştırılarak 15 dakika, 121 °C'de otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkılan besiyerleri oda sıcaklığına ulaştığında muhafaza için +4 °C'ye kaldırıldı.

2.1.2.4. Bile Esculin Agar (Oxoid, CM0888B)

Bileşimi: 14 g/L Pepton, 15 g/L Safra tuzları, 0,5 g/L Ferrik sitrat, 1 g/L Eskülin, 14 g/L Agar

pH (25°C): 7,1 ± 0,2

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 44,5 g/L olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü ve pH uygun değere getirildikten sonra sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 15 dakika, 121 °C'de sterilizasyonu yapılan besiyeri sonrasında 45-50 °C'ye soğutularak steril petrilere paylaştırıldı. Yaklaşık 12 saat oda sıcaklığında bekletilen besiyerleri muhafaza için +4 °C'ye kaldırıldı.

2.1.2.5. Moeller Decarboxylase Broth Base (BBL, 221659)

Bileşimi: 5 g/L Peptik hayvansal doku, 5 g/L Sığır eti ekstraktı, 0,5 g/L Dekstroz, 0,01 g/L Bromocresol moru, 0,005 g/L Kreozol kırmızısı, 0,005 g/L Piridoksa

pH (25°C): 6.2 ± 0.2

L-Arginine

Hazırlanması: Bir litre distile su içerisinde dehidre besiyerinden 10,52 gram ve % 1'lik L-Arginine'den on gram alınarak çözdürüldü ve pH uygun değere

getirildikten sonra sıcak su banyosunda eritildi. Hazırlanan besiyeri dokuzar ml, 16x150 mm'lik tüplere paylaştırılarak 15 dakika, 121 °C'de otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri oda sıcaklığına geldiğinde muhafaza için +4 °C'ye kaldırıldı.

2.1.2.6. Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri ve Şekerler

-Phenol Red Broth Base (Merck, 110987)

Bileşimi: 5 g/L Kazein peptonu, 5 g/L Et peptonu, 5g/L NaCl, 0.018 g/L Fenol kırmızısı

pH (25°C): $7,4 \pm 0,2$

Hazırlanması: Distile su içerisinde dehidre besiyeri 15 g/L olacak şekilde çözündürüldü ve pH uygun değere getirilerek sıcak su banyosunda eritildi. Hazırlanan besiyeri dokuzar ml, 16x150 mm'lik tüplere paylaştırılarak 15 dakika, 121 °C'de otoklavda sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan tüpler oda sıcaklığına geldiğinde muhafaza için +4 °C'ye kaldırıldı.

-D-mannitol (Merck, 105982)

-L-sorboz (Merck, 567692)

-D-riboz (Merck, 107605)

-Sükroz (Merck, 1076511000)

Hazırlanması: Karbonhidrat fermentasyon reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi amacıyla D-mannitol, Sükroz, L-sorboz ve D-riboz solüsyonlarının konsantrasyonları % 10'luk olacak şekilde hazırlandı. Bunun için her bir karbonhidrattan birer gram alınarak 100 ml'lik balon jojelerde, distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan

solüsyon steril filtrelerden geçirilerek, önceden sterilizasyonu yapılan 100 ml'lik erlenler içine aktarıldı ve muhafaza için +4 °C'ye kaldırıldı.

Karbonhidrat fermentasyon testi yapılacağı sırada, birer ml hazırlanmış olan karbonhidrat solüsyonlarından alınarak içinde dokuz ml'lik Phenol Red Broth Base besiyeri olan tüplere aktarıldı. Karbonhidrat solüsyonları eklendikten sonra saf bakteri kültüründen seçilen şüpheli koloniler besiyeri üzerine süspanse edilip, inkübasyon süresince bekletildikten sonra fermentasyon reaksiyonları değerlendirildi.

2.1.3. *Enterococcus* spp. İzolatlarının PCR Analizi Amacıyla Kullanılan Kimyasallar

2.1.3.1. *Taq* DNA Polymerase Set (Dr. Zeydanlı, Ankara, Türkiye)

Bileşimi: 5 U/μl *Taq* DNA Polimeraz enzimi, 10 x PCR Buffer, 25mM MgCl₂

2.1.3.2. dNTP Set

Bileşimi: 100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dGTP, 100 mM dTTP

2.1.3.3. DNA Ladder ve Yükleme Solüsyonu

- 100bp DNA Ladder (Dr. Zeydanlı, Ankara, Türkiye)

-6x Bromophenol Blue Loading Dye (AppliChem-BioChemica, Darmstad, Germany)

2.1.3.4. Primerler

Dutka-Malen ve ark. (1995), Cheng ve ark. (1997), Ke ve ark. (1999), Kariyama ve ark. (2000), Jackson ve ark. (2004) tarafından belirlenen PCR analizlerinde kullanılacak oligonükleotid primer çiftleri, Kariyama ve ark (2000) tarafından belirlenen *vanA* ve *vanB* genlerine ait spesifik primerler kullanıldı. Liyofilize formda satın alınan primerler ultra saf su ile istenilen yoğunluğa göre sulandırıldı.

2.1.3.5. TBE Solüsyonu (Tris-Boric Acid-EDTA)

-10 X TBE Solüsyonu (Dr. Zeydanlı, TBE 10-1, Lot No: 0803S7)

Bileşimi: 0,89 M Tris, 0,89 M Borik asit, 0,02 M EDTA

Hazırlanması: Agaroz jel yapımı ile elektroforez aşamasında kullanmak amacıyla TBE 1 X konsantrasyonunda hazırlandı. Bunun için, 10 X stok solüsyondan, 100 ml alınarak 1 litreye kadar distile su ile tamamlandı.

2.1.3.6. Ethidium Bromide (% 0,1'lik)

- Ethidium Bromide 10 mg/ml (AppliChem-GmbH, Darmstadt, Germany)

Hazırlanması: Bir µg/ml konsantrasyonda Ethidium Bromide solüsyonu elektroforez aşamasında kullanılmak üzere hazırlandı.

2.1.3.7. Agaroz Jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, USA)

Hazırlanması: PCR amplikasyonlarının elde edilmesinden sonra elektroforez aşaması için % 1,5'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, sıcak su banyosunda, 0,9 g

agaroz jel, 60 ml 1 X TBE solüsyonu içinde eritildi. Sıvı haldeki jel solüsyonunun sıcaklığı 45-50 °C'ye indiğinde, içine Ethidium Bromide solüsyonu eklenerek homojen olarak karıştığından emin olduktan sonra elektroforez küveti (MINICELL EC 370M) içine aktarıldı. Agaroz jel, oda sıcaklığında laminar flow içinde donduktan sonra elektroforez işleminde kullanıldı.

2.1.4. *Enterococcus* spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskler

2.1.4.1. Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM 337B)

Bileşimi: 300 g/L etin dehidre infüzyonu, 17,5 g/L Kazein hidrolizati, 1,5 g/L Nişasta, 17 g/L Agar

pH (25°C): 7,3 ± 0,2

Hazırlanması: Dehidre besiyeri 38 g/L konsantrasyonunda distile su içerisinde çözdürüldü ve pH uygun değere getirilerek sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 15 dakika, 121 °C'de sterilize edilen besiyeri sonrasında 45-50 °C'ye soğutularak kalınlığı yaklaşık 4 mm olacak şekilde steril petrilere paylaştırıldı. Oda sıcaklığında 12 saat kadar bekletilen besiyerleri muhafaza için +4 °C'ye kaldırıldı.

2.1.4.2. Antibiyotik Diskler

Çizelge 2.1. *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan antibiyotik diskler

Eritromisin (Oxoid, CT0020B)	15 µg
Kloramfenikol (Oxoid, CT0013B)	30 µg
Gentamisin (Oxoid, CT0794B)	120µg
Penisilin (Oxoid, CT0043B)	10 U
Streptomisin (Oxoid, CT1897B)	300 µg
Vankomisin (Oxoid, CT0058B)	30 µg
Linezolid (Oxoid, CT1650B)	30 µg
Kinupristin-Dalfopristin (Oxoid, CT1644B)	15 µg

2.2. Yöntem

2.2.1. *Enterococcus* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu

Tavuk kuşbaşı örnekleri, *Enterococcus* spp. izolasyonu amacıyla aseptik koşullar altında steril poşetler içine onar gram tartılarak, 90 ml TPS ile sulandırılarak iki dakika süresince karışım stomacherde (AES Easy Mix) homojenize edilmiştir. Slanetz–Bartley Agar’a homojenattan 0,1 ml alınıp ekimi yapılmış ve 24-48 saat süresince aerob koşullarda 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Wegener ve ark., 1997). İnkübasyon sonrası belirlenen 5 tipik pembe, kırmızı ya da kestane renkli koloni seçilerek % 0,6 oranında maya ekstraktı içeren Tryptone Soya Agar’a geçilmiştir. Tryptone Soya Agar’a geçilen suşlar 24 saat süresince 37°C’de aerob koşullarda inkübe edildikten sonra koloniler biyokimyasal reaksiyonlar açısından değerlendirilmek amacıyla +4°C’de saklanmıştır. Slanetz–Bartley Agar’da inkübasyon sonu oluşan tipik kırmızı, kestane ya da pembe renkli koloniler Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

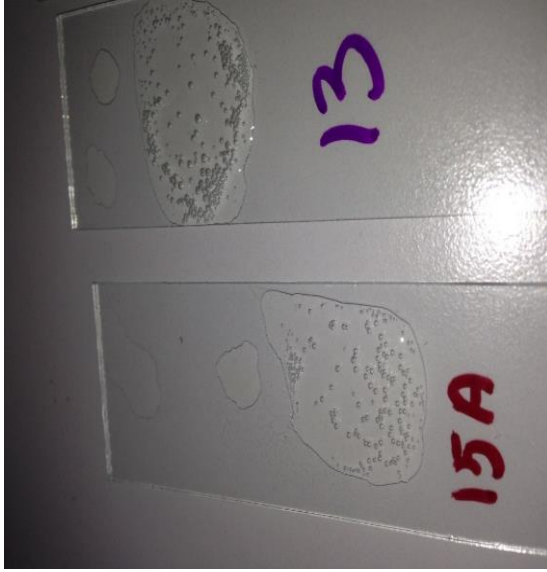


Şekil 2.1. Slanetz–Bartley Agar’da inkübasyon sonu oluşan tipik koloniler

2.2.2. Biyokimyasal Reaksiyonlar

2.2.2.1. Katalaz Reaksiyonu

İzolatların katalaz reaksiyonunu değerlendirmek amacıyla Brain Heart Infusion Broth’da üretilen 18-24 saatlik saf bakteri kültürlerinden öze ile alınarak lam üzerine konulmuş, saf bakteri kültürü üzerine bir ml % 3’lük bir ml H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılarak, hava kabarcıkları oluşturan suşlar pozitif (Şekil 2.2), oluşturmeyen suşlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar MRS Agar’a ekim yapılarak 10 °C ve 45 °C’lerde anaerob koşullarda 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda şüpheli kolonilerden diğer biyokimyasal testler yapılmıştır (Hartman ve ark., 1992; Psoni ve ark., 2003). MRS Agar’da üreyen şüpheli koloniler Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



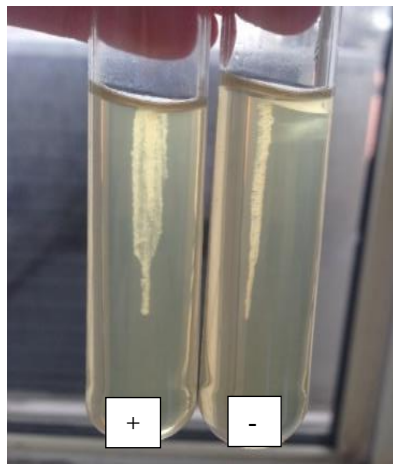
Şekil 2.2. Katalaz testinde hava kabarcıklarının oluşumu



Şekil 2.3. MRS Agar'da üreyen şüpheli koloniler

2.2.2.2. Motilite reaksiyonu

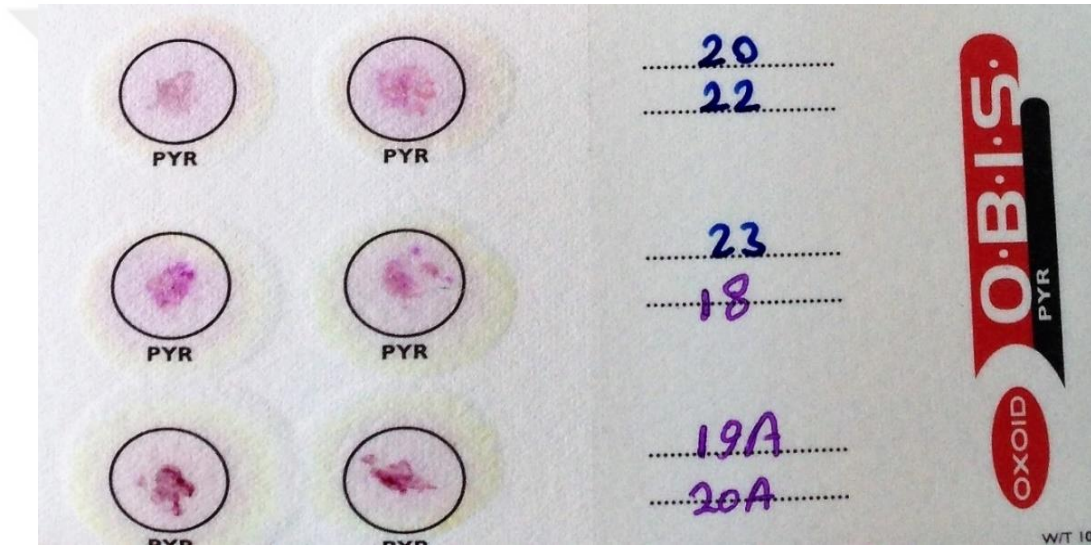
Motilite testi için bir öze dolusu koloni alınıp SIM Medium'a batırılarak ekim yapılmış, 30 °C'de 24 saat aerob koşullarda inkübe edilmiş ve değerlendirilmiştir. Hareket pozitif kolonilerde üreme ekim hattının dışına taşmış ve besiyerinde bulanıklık oluşmuştur. Hareket negatif kolonilerde ise, üreme ekimin yapıldığı hat üzerinde kalmıştır (Facklam ve Elliott, 1995) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. SIM Medium'da hareket pozitif ve hareket negatif şüpheli enterokok kolonileri

2.2.2.3. L- pirolidonil- β -naftilamid (PYR) Reaksiyonu

İzolatların PYR hidrolizini değerlendirmek amacıyla PYR emdirilmiş filtre kağıdı üzerine 24 saatlik saf bakteri kültüründen 1–2 koloni konulduktan sonra bir damla PYR ayırıcı damlatılarak iki dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kırmızımtırak renk veren suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.5). *E. cecorum*, *E. saccharoliticus*, *E. columbia* türleri haricindeki enterokoklar L-pirolidonil- β -naftilamid (PYR) hidrolizini gerçekleştirmektedir (Hartman ve ark., 1992).



Şekil 2.5. L- pirolidonil- β -naftilamid Reaksiyonunda kırmızımtırak renk veren pozitif suşlar

2.2.2.4. Eskülin Reaksiyonu

Eskülin hidroliz reaksiyonu için 24 saatlik saf bakteri kültüründen Bile Esculin Agar'a ekim yapılmış, 35 °C'de maksimum yedi gün olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır (Facklam ve Elliott, 1995). İnkübasyon sonucunda eskülinin hidrolize olup eskuletin ortaya çıkması ve eskuletin'in ise ortamdaki Fe^{+3} ile reaksiyona girerek koyu kahve-siyah renge dönüşmesi o suşun pozitif olduğunu belirtmektedir (Hartman ve ark., 1992) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Bile Eskülin Agar'da siyah renk oluşturan pozitif suşlar

2.2.2.5. Arjinin Dekarboksilasyon Reaksiyonu

Arjinin dekarboksilasyon reaksiyon testi için, Moeller Decarboxylase Broth Base besiyerine şüpheli kolonilerden ekim yapılmış ve yüzeyi steril mineral yağ ile kaplanmış, 35 °C'de maximum yedi gün olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır kullanılmıştır. Besiyerini mavi mor renge dönüştüren suşlar pozitif kabul edilirken, besiyerini sarı renge dönüştüren suşlar negatif olarak değerlendirilmektedir (Facklam ve Elliott, 1995) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Moeller Decarboxylase Broth Base’de pozitif ve negatif suşlar

2.2.2.6. Pigmentasyon Reaksiyonu

Pigmentasyon reaksiyonu için bakteri kültüründen Tryptone Soya Agar’a ekim yapılmış ve besiyerleri aerobik ortamda, 24 saat, 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında steril pamuklu bir svapla toplanan kolonilerin pigmentasyonuna bakılmıştır. Svap yüzeyinde gözlemlenen sarı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Facklam ve Collins, 1989).

2.2.2.7. Karbonhidrat Fermentasyon Reaksiyonları

D-mannitol, Sükroz, L-sorboz, D-riboz yönünden karbonhidrat fermentasyon reaksiyon testleri yapılmıştır. Phenol Red Broth Base’e Agar’a % 1’lik olacak şekilde karbonhidratlar eklenmiştir. Karbonhidratlı besiyerine, 24 saatlik saf bakteri kültüründen alınan şüpheli koloni süspanse edilerek 24 saat, 37 °C’de, aerobik koşullar altında inkübe edilmiştir. Besiyerinin sarı renk alması suşun pozitif olduğunu, rengin değişmemesi ise negatif olduğunu göstermektedir (Şekil 2.8). Çizelge 2.1’de *Enterococcus* spp. özellikleri özetlenmiştir (Manero ve Blanch, 1999).

Klasik kültür yöntemleri ile *Enterococcus* spp. identifikasyonunu takiben izolatlar, PCR ile doğrulanıncaya kadar -20°C’de cryoviallerde muhafaza edilmiştir. Cryovialler 0,6 ml gliserol ve 0,9 ml Brain Heart Infusion Broth’da üretilen 18-24 saatlik saf bakteri kültürü karışımını içermektedir.

Çizelge 2.2. *Enterococcus* spp. özellikleri (Manero ve Blanch, 1999).

<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>
Mannitol	+	-	+	+	+	-
Sukroz	+	F	+	+	+	+
Riboz	+	+	+	+	+	+
Sorboz	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	F	-	-	F	+	F
Katalaz	-	-	-	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	F	+	+	+	+	+
Eskülin	+	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+	+
Motilite	+	-	-	-	+	-
Sarı pigment	+	-	-	-	-	-
4°C’ de gelişme	VY	VY	-	+	-	VY
10°C’ de gelişme	+	+	+	+	+	+

F: Farklı sonuçlar elde edilmiş, V: % 26–74 oranında pozitif, VY: Veri yok, + : % 90’dan fazlası pozitif, - : % 10 ve daha az oranda pozitif. (+): % 75–89 oranında pozitif, (-): % 11–25 oranında pozitif



Şekil 2.8. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrası Phenol Red Broth Base’de karbonhidrat fermentasyonu bakımından pozitif ve negatif suşlar

2.2.3. PCR Analizi ile *Enterococcus* spp. Doğrulanması

Enterokok türlerinin PCR ile doğrulanması, *tuf* geni saptanarak yapılmıştır. Bu amaçla Ent 1 ve Ent 2 primerleri kullanılmıştır (Ke ve ark., 1999). Bunun için DNA ekstraksiyonu Chelex 100 resin tekniği kullanılarak yapılmıştır. Cryoviallerde, -20 °C’de saklanan izolatlar, Brain Heart Infusion Broth’a geçilerek 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 1 ml BHI brothdan mikrosantrifüj tüplerine alınarak 6 dakika, 12.000 g’de santrifüj yapılmıştır (Eppendorf Centrifuge 5417R). Pelet % 6 Chelex 100 resinden 200 µl konularak resüspanse edilip, üzerine 2 µl proteinaz K eklenmiştir. Süspansiyonlar karıştırılarak 40 dakika 55 °C’de su banyosunda inkübasyona bırakıldıktan sonra 8 dakika boyunca 100°C’de su banyosunda bekletilmiştir. Tekrar 3 dakika, 12.000 g’de santrifüj edilip PCR aşamalarına kadar muhafaza edilmek üzere -20 °C’ye kaldırılmıştır.

PCR amplifikasyonu, toplam 50 µl hacimde gerçekleştirilmiş olup bileşiminde 1X PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (Ph 8.3), 1,5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 50 mmol l⁻¹ KCl,

% 0,01 Tween–20], 2,5 U Taq DNA polymerase, her bir dNTP'den 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$, her bir primerden 10 pmol ve 10 μl örnek DNA içeren PCR karışımı kullanılmıştır. Amplifikasyon işlemi, thermal cycler'da (Biometra Personel Cycler) ilk denatürasyon işlemi olan 94 °C'de on dakikanın ardından, 30 siklus 94 °C'de 15 saniye denatürasyon, 55 °C'de 15 saniye bağlanma ve 72 °C'de 45 saniye DNA uzatma ve son olarak 72 °C'de beş dakika uzatma işlemleri ile yapılmıştır (Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010). PCR işlemi sonrasında elde edilen ampliconlar bromophenolphicol blue ile boyanmış, ethidium bromide (0,1 $\mu\text{g/ml}$) ile boyanan % 1,5 agaroz jelde yürütülmüş ve bandlar UV transluminator (Biometra TI1 UV 9511011) üzerinde jel dokümantasyon sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Oluşan spesifik bandlar DNA marker ve pozitif kontrol yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilerek jel görüntüleme sistemi aracılığıyla dokümantasyonu yapılmıştır (Syn-gene, Cambridge, UK).

E. faecalis ATCC 29212, *E. faecium* tetM 7003, *E. faecalis* WHO3 (*vanA*⁺), *E. faecalis* WHO14 (*vanB*⁺), *E. gallinarum* C30BR, *E. durans* (wild type), *E. hirae* (wild type) suşları pozitif kontrol için kullanılmıştır.

2.2.4. Multipleks PCR ile *Enterococcus* spp. İdentifikasyonu

E. faecalis, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. gallinarum* türlerinin doğrulanması amacıyla 2 farklı Multipleks PCR protokolü uygulanmıştır. *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, türlerinin doğrulanması için Kariyama ve ark.'nın (2000), *E. durans*, *E. hirae* türlerinin doğrulanması için ise Jackson ve ark.'nın (2004) multipleks PCR protokolleri kullanılmıştır. Çizelge 2.2'de Multipleks PCR'da kullanılan primer çiftleri gösterilmiştir.

Template DNA olarak yukarıda belirtilen ekstraktlar kullanılmıştır. *E. durans*, *E. hirae* türlerinin doğrulanması amacıyla hazırlanan karışım toplam 50 μl hacimde olup bileşiminde 1 X PCR buffer [16 mmol l^{-1} (NH₄)₂SO₄, % 0,01 Tween–20, 67 mmol l^{-1} Tris-HCl (pH 8.8)], 2,5 mmol l^{-1} MgCl₂, her bir dNTP'den 0,2 mmol l^{-1} , her bir primerden 50 pmol, 2 U Taq DNA polymerase ve 10 μl örnek DNA içeren PCR

karışımı kullanılmıştır. *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. faecalis* türlerinin doğrulanması amacıyla hazırlanan karışım toplam 50 µl hacimde olup bileşiminde 1X PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), % 0,01 Tween-20, 50 mmol l⁻¹ KCl], 1,5 mmol l⁻¹ MgCl₂, her bir dNTP'den 0,2 mmol l⁻¹, her bir primerden 50 pmol, 0,625 U Taq DNA polymerase ve 10 µl örnek DNA içeren PCR karışımı kullanılmıştır. Her iki PCR master miks amplifikasyonu için thermal cycler'da (Biometra Personal Cycler) başlangıç denatürasyonu 94°C'de beş dakika (*E. durans* ve *E. hirae* için 95°C'de dört dakika), ilk denatürasyon işlemini takiben 30 siklus 94°C'de 1 dakika denatürasyon (*E. durans* ve *E. hirae* için 95°C'de 30 saniye), 54 °C'de bir dakika bağlanma (*E. durans* ve *E. hirae* için 55 °C-60 °C'de bir dakika), 72 °C'de bir dakika DNA uzatma ve son olarak 72°C'de bir dakika uzatma (*E. durans* ve *E. hirae* için 72 °C'de yedi dakika) yapılmıştır (Kariyama ve ark., 2000 ve Jackson ve ark., 2004). PCR işlemini takiben elde edilen amplikonlar bromophenolphicol blue ile boyanarak, ethidium bromide (0,1 µg/ml) ile boyanan % 1,5 agaroz jelde yürütülerek ve bandlar UV transluminator (Biometra TII UV 9511011) üzerinde jel dökümantasyon sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Oluşan spesifik bandlar DNA marker ve pozitif kontrol yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilerek jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyonu yapılmıştır (Syn-gene, Cambridge, UK).

E. faecalis ATCC 29212 (*tuf* geni pozitif), *E. faecium* tetM 7003, *E. faecalis* WHO3 (*vanA*⁺), *E. faecalis* WHO14 (*vanB*⁺), *E. gallinarum* C30BR, *E. durans* (wild type), *E. hirae* (wild type) suşları pozitif kontrol için kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. PCR analizlerinde kullanılan oligonükleotid primer çiftleri (Ke ve ark., 1999; Dutka-Malen ve ark., 1995; Kariyama ve ark., 2000; Cheng ve ark., 1997; Jackson ve ark., 2004).

Hedef gen	Oligonükleotid primer çiftleri	Sekans (5' - 3')	PCR ürünü (bp)	Kaynaklar
<i>tuf</i>	Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	Ke ve ark. (1999)
	Ent2	AAC TTCGTCACCAACGCGAAC		
<i>vanC1E. gallinarum</i>	C1	GGTATCAAGGAAACCTC	822	Dutka-Malen ve ark. (1995)
	C2	CTTCCGCCATCATAGCT		
<i>ddlE. faecalis</i>	ddlE1	ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG	941	Kariyama ve ark. (2000)
	ddlE2	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT		
<i>ddlE. faecium</i>	ddlF1	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	658	Cheng ve ark. (1997)
	ddlF2	TATGACAGCGACTCCGATTCC		
<i>ddlE. durans</i>	DU1	CCTACTGATATTAAGACAGCG	295	Jackson ve ark. (2004)
	DU2	TAATCCTAAGATAGGTGTTTG		
<i>ddlE. hiraе</i>	HI1	CTTTCTGATATGGATGCTGTC	187	Jackson ve ark. (2004)
	HI2	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG		

2.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi

Disk difüzyon yöntemi aracılığıyla izolatların antimikrobiyel duyarlılık profilleri saptanmıştır. Bu işlem, CLSI tarafından bildirilen yöntem esas alınarak Mueller Hinton Agar'da (Oxoid, CM0337B) ve eritromisin (15 µg, Oxoid CT0020B), vankomisin (30 µg, Oxoid CT0058B), kloramfenikol (30 µg, Oxoid CT0013B), gentamisin (120 µg, Oxoid CT0794B), kinupristin-dalfopristin (15 µg, Oxoid CT1644B), penisilin (10 U, Oxoid CT0043B), streptomisin (300 µg, Oxoid CT1897B), linezolid (30 µg, Oxoid CT1650B) olmak üzere toplam 8 antibiyotik diski kullanılarak yapılmıştır (Anon, 2011). Bu amaçla; PCR metoduyla identifikasyonu yapılan *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. hiraе*, *E. gallinarum* izolatları Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM0225) içine transfer edilip 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop ND-100, Delaware, USA) kullanılarak türbidite standardı doğrulanmıştır. Broth içindeki kültürün 625 nm dalga boyunda 0,08-0,13 aralığında sabitlendiği değer CLSI

standardı baz alındığında optimum olarak değerlendirilmiştir. Türbidite ayarlanmasının ardından steril svab kültür içerisine daldırılıp tüpün çeperinden süzdürülerek Mueller Hinton Agar (4 mm kalınlığında) yüzeyine yayılmıştır. Agar yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri (120 mm çapındaki plak içerisinde en fazla sekiz disk olacak şekilde) yerleştirilerek 24 saat 35°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında disklerin etrafında oluşmuş olan inhibisyon zonları ölçülüp CLSI standartlarında belirtildiği gibi dirençli, orta düzeyde dirençli ve duyarlı olarak yorumlanmıştır (Anon, 2011).

S. aureus ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* WHO3 (*vanA*⁺), *E. faecalis* WHO14 (*vanB*⁺), *E. coli* ATCC 25922 suşları pozitif kontrol için kullanılmıştır.

2.2.6. *E. faecalis* ve *E. faecium* İzolatlarında Multipleks PCR ile *vanA* ve *vanB* Genlerinin Tespiti

Seçilen *vanA* ve *vanB* genlerine spesifik primerler ve PCR protokolü Kariyama ve ark.’nın (2000) yaptıkları çalışmaya göre uygulanmıştır. Bu amaçla multipleks PCR’da kullanılan primer çiftleri Çizelge 2.3’te gösterilmiştir. Daha önce PCR amplifikasyonunu için hazırlanan izolatlardan 5 µl template DNA kullanılmıştır. Multipleks PCR toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiş olup bileşiminde 1 X PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), % 0,01 Tween-20, 50 mmol l⁻¹ KCl], 1,5 mmol l⁻¹ MgCl₂, her bir dNTP’den 0,2 mmol l⁻¹, her bir primerden 5 pmol, 0,625 U Taq DNA polymerase karışımı kullanılmıştır. Amplifikasyon işlemi, thermal cycler’da (Biometra Personel Cycler) ilk denatürasyon işleminin olan 94 °C’de beş dakikanın ardından, 30 siklus 94 °C’de bir dakika denatürasyon, 54 °C’de bir dakika bağlanma ve 72 °C’de bir dakika DNA uzatma ve son olarak 72°C’de on dakika uzatma yapılmıştır. PCR işleminin ardından elde edilen amplikonlar ethidium bromide (0,1 µg/ml) ile boyanan % 1,5 agaroz jelde yürütülmüş ve bandlar UV transluminator (Biometra TII UV 9511011) üzerinde jel dokümantasyon sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Oluşan spesifik bantlar DNA marker ve pozitif kontrol

yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilerek jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyonu yapılmıştır.

E. faecalis ATCC 29212 (*tuf* geni pozitif), *E. faecium* tetM 7003, *E. faecalis* WHO3 (*vanA*⁺), *E. faecalis* WHO14 (*vanB*⁺), *E. gallinarum* C30BR, *E. durans* (wild type), *E. hirae* (wild type) suşları pozitif kontrol için kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Multipleks PCR’da kullanılan *vanA* ve *vanB* oligonükleotid primer çiftleri (Evers ve ark., 1993; Handwerger ve ark., 1992).

Hedef gen	Oligonükleotid primer çiftleri	Sekans (5' - 3')	PCR ürünü (bp)	Kaynaklar
VanA	A1	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA	1030	Evers ve ark. (1993)
	A2	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA		
VanB	B1	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA	433	Handwerger ve ark. (1992)
	B2	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA		

2.2.7. E-Test Yöntemi ile Vankomisin İzolatlarına Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Türbidesi 0,5 McFarland standardına göre ayarlanmış olan izolatlar Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM0337B) yüzeyine svab tekniği aracılığıyla yayılmıştır. Takibinde agar yüzeyine, vankomisin içeren E-test şeritleri yerleştirilmiştir. Plaklar 24-48 saat 35 °C’de inkübasyona bırakılıp MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri tespit edilmiştir. MİK değeri, şerit üzerindeki ölçek ile şerit etrafında şekillenen inhibisyon elipsinin kesiştiği nokta olarak hesaplanmıştır (Huang ve ark., 1992). Bu nokta CLSI standardına göre vankomisin direnci olan enterokoklar için $\geq 32 \mu\text{g/ml}$, vankomisin duyarlılığına sahip enterokoklar için $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ olarak kabul edilmiştir (Anon, 2014).

3. BULGULAR

Çalışmada tavuk kuşbaşı örneklerinin *Enterococcus* spp. varlığının izolasyon ve identifikasyonu, antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi, *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında *vanA* ve *vanB* vankomisin direnç genlerinin belirlenmesi, fenotipik olarak vankomisin direnci saptanan izolatlarda MİK değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında 120 tavuk kuşbaşı örneği, Eylül, Ekim, Kasım, Aralık, Ocak, Şubat ve Mart aylarında Ankara'daki 14 farklı markadan orijinal paketinde ve 14 açıkta dökme satış noktasından olmak üzere toplam 28 farklı satış noktasından toplanmış ve analiz edilmiştir. Satış noktaları kendi içlerinde numaralandırılmıştır. Analiz sonuçları belirtilen sıraya göre değerlendirilmiştir.

3.1. *Enterococcus* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu

Enterococcus spp. yönünden analiz edilen 120 tavuk kuşbaşı örneğinin 39'u paketli, 81'i açık olarak satılan tavuk örneklerinden oluşmaktadır. Paketli örneklerin 12 (30,8)'inin, açık olarak satışa sunulan örneklerin ise 24 (% 29,6)'ünün *Enterococcus* spp. ile kontamine olduğu saptanmıştır.

Paketli örneklerin dokuzu (% 75) *E. faecalis*, biri (% 8,3) *E. faecium*, biri (% 8,3) ise *E. gallinarum* olarak belirlenmiş, birinin ise türü tespit edilememiştir. Açık olarak satışa sunulan örneklerin ise dokuzu (% 37,5) *E. faecium*, sekizi (% 33,3) *E. faecalis*, biri (% 4,2) ise *E. casseliflavus* olarak belirlenmiş, üç izolatın ise türü tespit edilememiştir (Çizelge 3.1).

E. faecalis olarak belirlenen 16 izolat, 11 farklı satış noktasına ait örneklerden izole edilmiştir. Satış noktaları altı farklı marka ve beş açıkta dökme satış noktasından oluşmaktadır. *E. faecium* olarak belirlenen 10 izolat, sekiz farklı satış noktasına ait örneklerden izole edilmiştir. *E. faecium* izolatlarının izole edildiği örneklerin bir marka ve yedi açıkta dökme satış noktasından alındığı tespit edilmiştir.

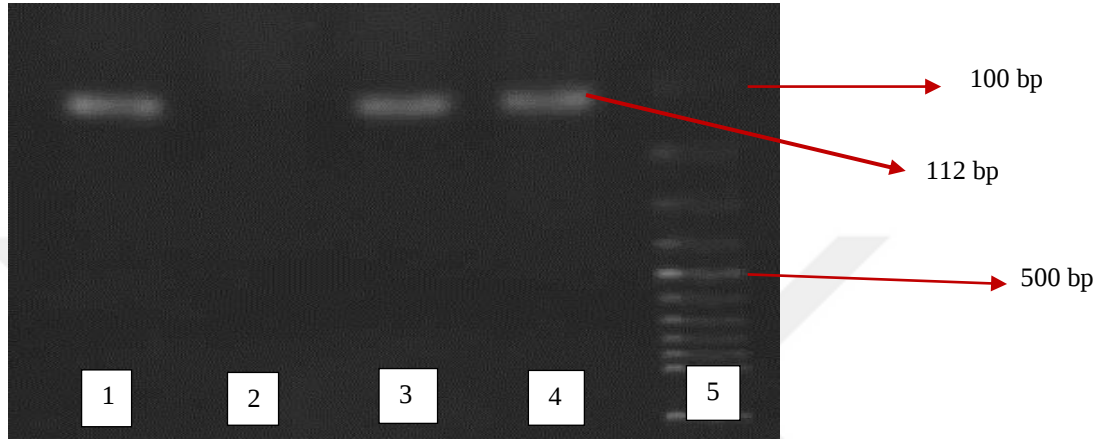
E. gallinarum izolatının orijinal paketinde alınan markalı bir örnekten, *E. casseliflavus* izolatının ise açıkta dökme satış noktasından alınan bir örnekten izole edildiği saptanmıştır.

E. faecalis izolatlarının üçünün (% 18,7) aynı açıkta dökme satış noktasından, *E. faecium* olarak belirlenen izolatların ikisinin (% 20) aynı açıkta dökme satış noktasından, iki tanesinin ise farklı bir açıkta dökme satış noktasından; *E. durans* izolatlarının ise ikisinin (% 50) aynı açıkta dökme satış noktasına, diğerlerinin ise farklı satış noktalarına ait örneklerden izole edildiği belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Satış noktalarına göre tavuk kuşbaşı örneklerinde *Enterococcus* spp. izolat sayıları

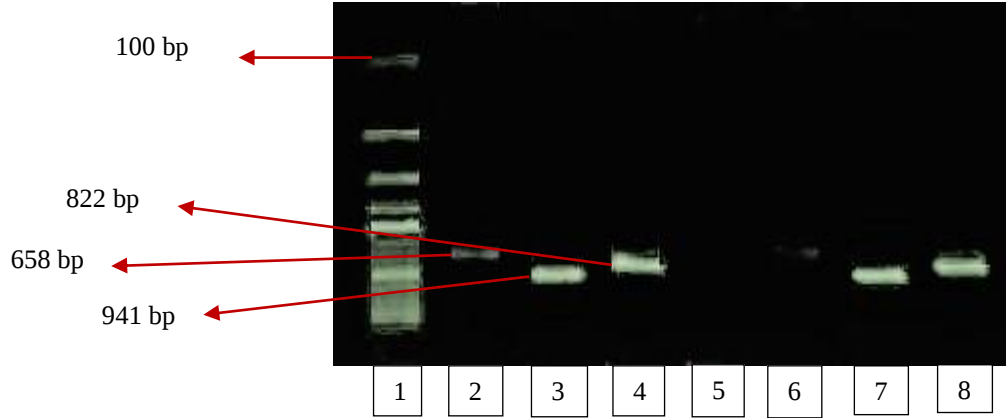
Marka	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Diğer <i>Enterococcus</i> spp.
1	2	1	-	-	-	-
2	2	-	-	-	-	-
3	1	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	1	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	2	-	-	-	-	-
8	1	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	1
12	1	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
Açıkta dökme satış noktası	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	Diğer <i>Enterococcus</i> spp.
1	3	-	-	-	-	-
2	1	2	1	-	-	1
3	1	1	-	-	-	-
4	1	1	-	-	1	-
5	-	2	-	-	-	-
6	-	1	-	-	-	-
7	-	1	-	-	-	-
8	-	-	1	-	-	-
9	1	-	-	-	-	-
10	-	-	2	-	-	-
11	-	1	-	-	-	2
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-

Çalışmada 120 tavuk kuşbaşı örneğinin 36'sının (% 30) *Enterococcus* spp. olduğu PCR analizi ile doğrulanmıştır. Pozitif örneklerle ait plaklardan seçilen alt izolatlar aynı *Enterococcus* spp. türüne ait olarak saptandığı için her bir pozitif örnek için bir izolat seçilerek analizler yapılmıştır. PCR ile *tuf* geni tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



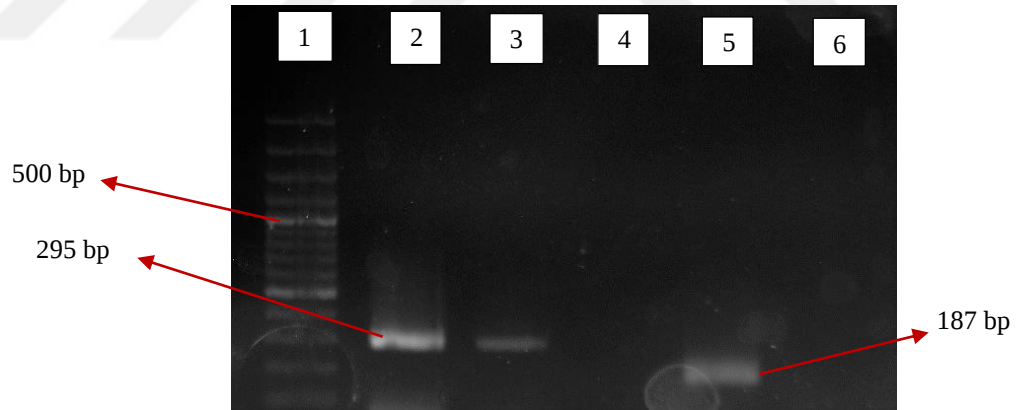
Şekil 3.1. PCR ile *tuf* geni tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: Pozitif kontrol; *E. faecalis* ATCC 29212, 2: Negatif kontrol 3-4 : *tuf* geni pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 5: 100 bp DNA marker)

Enterococcus spp. olarak belirlenen 36 izolatın 16'sı (% 44.4) multiplex PCR yöntemiyle *E. faecalis*, 10'u (% 27.8) *E. faecium*, biri (% 2.8) ise *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır (Şekil 3.1). Multiplex PCR ile elde edilen tanımlama sonuçları, biyokimyasal test sonuçları ile örtüşmüştür.



Şekil 3.2. Multiplex PCR ile *ddlE. faecalis* ve *ddlE. faecium* genleri tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü [1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol *E. faecium* tetM 7003 3: Pozitif kontrol *E. faecalis* ATCC 29212 4: Pozitif kontrol *E. gallinarum* C30BR 5: Negatif kontrol 6: *ddlE. faecium* geni pozitif *Enterococcus* spp. izolatı 7: *ddlE. faecalis* geni pozitif *Enterococcus* spp. izolatı 8: *vanC1E. gallinarum* geni pozitif *Enterococcus* spp. izolatı]

E. durans ve *E. hirae* izolatlarının identifiye edilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir diğer multiplex PCR protokolüyle ise dört (% 11.1) izolat *E. durans* olarak belirlenmiş fakat *E. hirae* izolatı elde edilememiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Multiplex PCR ile *ddlE. durans* geni tespit edilenve *ddlE. hirae*geni belirlenemeyen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü [1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol - *E. durans* (wild type) 3:*ddlE. durans* pozitif *Enterococcus* spp. izolatı 4: Negatif kontrol 5: Pozitif kontrol - *E. hirae* (wild type) 6:*ddlE. hirae* negatif *Enterococcus* spp. izolatı]

Biyokimyasal testler kullanılarak yapılan analizlerde, izolatlardan biri (% 2,8) ise *E. casseliflavus* olarak belirlenmiş, dört izolatın türü tespit edilememiştir.

Enterococcus spp. ile kontamine olduğu saptanan 36 izolatın dördünün (% 11,1) Mart, ikisinin Kasım, beşinin (% 13,9) Aralık, 16 (% 44,4)'sının Ocak, altısının (% 16,7) Şubat ayına ait örneklerden izole edildiği görülmektedir. Mart ayına ait dört izolatın üçünün *E. faecalis*, Ekim ayına ait iki izolatın *E. faecium*, Kasım ayına ait iki izolatın birinin *E. faecalis*, birinin ise *E. faecium*; Aralık ayına ait beş izolatın üçünün *E. faecium*, ikisinin ise *E. faecalis*; Ocak ayına ait 16 izolatın altısının *E. faecalis*, üçünün *E. faecium*, birinin ise *E. casseliflavus*; Şubat ayına ait altı izolatın üçünün *E. faecalis*, birinin *E. faecium*, birinin ise *E. gallinarum* olduğu belirlenmiştir. Tüm *E. durans* izolatları Ocak ayında alınan örneklerden izole edilmiştir (Çizelge 3.2).

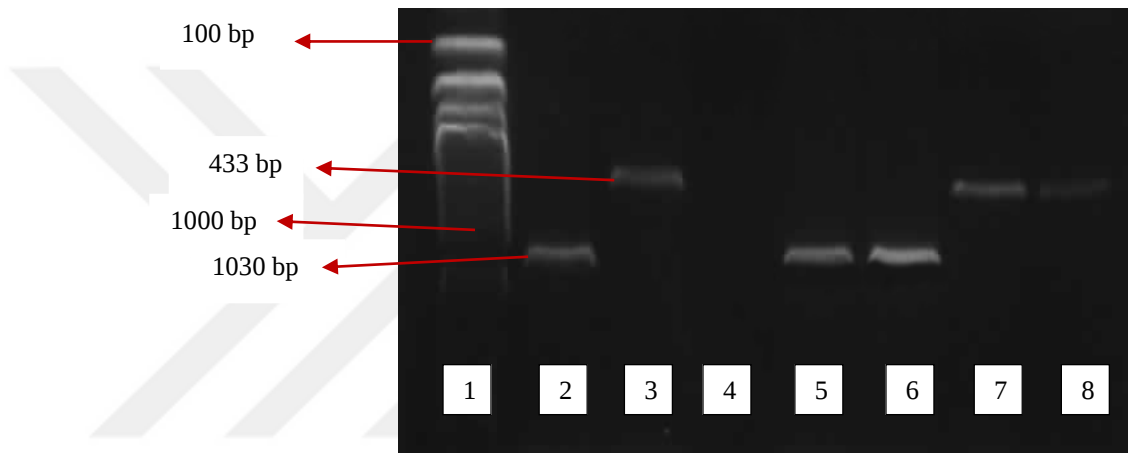
Çizelge 3.2. Örneklerin alındığı tarihlere göre *Enterococcus* spp. izolasyonu ve antibiyotik direnç profilleri

İzolasyon No	Tarih	Satış Noktası	Tür	Fenotipik Direnç	Fenotipik Direnç (I)	Genotipik Direnç	MIC
3	17.03.2013	Marka 1	Efa	E, VA, LZD, QD	C	vanA	4
4	17.03.2013	Marka 2	Efa	VA, QD	E, LZD	vanA	8
9	22.03.2013	Açık 2	ND	E, VA, QD	C, LZD		4
10	22.03.2013	Açık 1	Efa	VA, LZD, QD	E, S	vanA	4
17	27.10.2013	Açık 2	Efec	VA, QD	E, C, LZD	-	8
19	27.10.2013	Açık 3	Efec	-	E, VA, LZD, QD	-	2
23	03.11.2013	Açık 2	Efec	-	E, C, S, VA, LZD, QD	-	4
31	10.11.2013	Marka 3	Efa	E, C, VA, LZD, QD	-	vanA	8
54	05.12.2013	Açık 4	Efa	E, VA, QD	C, LZD	vanA, vanB	4
56	05.12.2013	Açık 5	Efec	E, P, S, QD	C	-	
65	12.12.2013	Açık 5	Efec	-	E	-	
66	12.12.2013	Açık 4	Efec	E, VA, QD	C, LZD	-	1
74	02.01.2014	Açık 2	Efa	E, VA, QD	C	vanA	4
76	02.01.2014	Açık 1	Efa	E, C, CN, S, VA, QD	LZD	-	4
78	02.01.2014	Açık 6	Efec	LZD	E, C, CN, VA	-	4
79	02.01.2014	Açık 7	Efec	E, C, P, S, QD	-	-	
80	02.01.2014	Açık 11	ND	E, C, P, QD	CN	-	
82	10.01.2014	Açık 1	Efa	E, S, VA, LZD, QD	C	vanB	4
83	10.01.2014	Açık 3	Efa	E, C, LZD, QD	S, VA	vanB	4
84	10.01.2014	Açık 4	Cas	-	E	-	
85	10.01.2014	Açık 11	ND	E, P	C	-	
86	10.01.2014	Açık 8	Du	E, LZD, QD	C, CN, S	-	
88	10.01.2014	Açık 9	Efa	E, S, VA, QD	C, LZD	-	2
89	10.01.2014	Açık 10	Du	E, C, CN, P, S, VA, LZD, QD		-	dirençli
94	16.01.2014	Açık 2	Du	E, VA, QD	C, CN, LZD	-	4
95	16.01.2014	Açık 10	Du	P, QD	E	-	
100	16.01.2014	Açık 11	Efec	E, C, P	-	-	
103	16.01.2014	Marka 12	Efa	E, VA, QD	C, LZD	-	8
105	16.01.2014	Marka 1	Efa	P, VA, QD	E, C, LZD	-	4
106	22.12.2014	Marka 8	Efa	E, VA, LZD, QD	-	-	1
109	21.02.2015	Marka 7	Efa	E, S, VA, LZD, QD	C, CN	-	4
110	21.02.2015	Marka 2	Efa	E, P, VA, QD	C	-	4
111	21.02.2015	Marka 5	Gal	E, C, CN, S, VA, LZD, QD	-	-	4
114	21.02.2015	Marka 1	Efec	E, C, P, LZD	S, VA, QD	-	4
116	21.02.2015	Marka 11	ND	E, P, LZD, QD	VA	-	4
117	21.02.2015	Marka 7	Efa	E, P	VA, LZD	-	4

E. faecalis : Efa; *E. faecium* : Efec; *E. gallinarum*: Gal; *E. durans*: Du; *E. casseliflavus*: Cas; ND: Belirlenemeyen tür; E: Eritromisin (E-15); C: Kloramfenikol (C-30); CN: Gentamisin (CN-120); P: Penisilin (P-10); S: Streptomisin (S-300); VA: Vankomisin (VA-30); LZD: Linezolid (LZD-30); QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15)

3.2. *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında multiplex PCR yöntemi ile *vanA* ve *vanB* genlerinin belirlenmesi

Enterococcus spp. olarak belirlenen 36 izolatın altısının (% 16,7) *vanA*, üçünün (% 8,3) *vanB* geni yönünden pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 3.4). *VanA* ve *vanB* genlerinin izole edildiği toplam dokuz izolatın tamamının *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlardan bir tanesinin *vanA* ve *vanB* genlerinin ikisine de sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Multiplex PCR ile *vanA* ve *vanB* genleri tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü [1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol (*vanA*) 3: Pozitif kontrol (*vanB*) 4: Negatif kontrol 5-6: *vanA* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 7-8: *vanB* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları]

3.3. Antibiyotik direnç profillerinin saptanması için disk difüzyon yöntemi

İzolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.11). Bu amaçla yapılan analiz sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. izolatlarının panelde bulunan sekiz antibiyotiğe yüksek oranda dirençli ve/veya orta düzeyde dirençli oldukları belirlenmiştir. İzolatlara ait antibiyotik direnç profilleri Çizelge 3.3’de verilmiştir. İzolatların belirlenen antibiyotik direnç profillerine göre, 36 izolatın 26’sının (% 72,2) üç ve üzeri, yedisinin (% 19,4) beş ve üzeri, birinin (% 2,8) ise tüm antibiyotiklere dirençli oldukları saptanmıştır.



Şekil 3.5. İzolatlara ait Disk difüzyon yöntemi

Çizelge 3.3. *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)	<i>Enterococcus</i> pozitif izolatlar (%)		
	R	I	S
Eritromisin (E-15)	26 (% 72,2)	10 (% 27,8)	-
Kloramfenikol (C-30)	9 (% 25)	18 (% 50)	9 (% 25)
Gentamisin (CN-120)	3 (% 8,3)	5 (% 13,9)	28 (% 77,8)
Penisilin (P-10)	12 (% 33,3)	-	24 (% 66,7)
Streptomisin (S-300)	8 (% 22,2)	5 (% 13,9)	23 (% 63,9)
Vankomisin (VA-30)	20 (% 55,5)	7 (% 19,4)	9 (% 25)
Linezolid (LZD-30)	13 (% 36,1)	13 (% 36,1)	10 (% 27,8)
Kinupristin/dalfopristin (QD-15)	27 (% 75)	3 (% 8,3)	6 (% 16,7)

R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı

İzolatların % 72'si eritromisine direnç göstermiştir. Eritromisine dirençli 26 izolatın 16'sı *E. faecalis*, 10'u *E. faecium*, üçü *E. durans*, biri *E. gallinarum* olarak belirlenmiştir. Eritromisine orta derecede dirençli 10 izolatın beşi *E. faecium*, üçü *E. faecalis*, biri *E. casseliflavus*, biri *E. durans* olarak belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen tüm izolatların eritromisine dirençli ya da orta derecede dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamında izole edilen *E. casseliflavus* izolatı çalışma

kapsamında test edilen sekiz antibiyotikten sadece eritromisine orta derecede dirençli, diğer antibiyotiklerin hepsine duyarlı olduğu saptanmıştır.

İzolatların % 25'inin kloramfenikole dirençli olduğu saptanmıştır. Kloramfenikole dirençli dokuz izolatın üçü *E. faecalis*, üçü *E. faecium*, biri *E. durans*, biri *E. gallinarum* olarak belirlenmiştir. Kloramfenikole orta derecede direnç gösteren 18 izolatın dokuzu *E. faecalis*, beşi *E. faecium*, ikisi *E. durans* olarak identifiye edilmiştir.

İzolatların % 8'i gentamisine dirençlidir. Gentamisine direnç gösteren üç izolatın biri *E. faecalis*, biri *E. gallinarum*, biri *E. durans* olarak belirlenmiştir. Gentamisine orta derecede direnç gösteren beş izolatın ikisi *E. durans*, biri *E. faecalis*, biri *E. faecium* olarak saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen izolatların en az dirençli oldukları antibiyotik gentamisin olmuştur.

İzolatların penisilin antibiyotiğine olan dirençleri % 33 olarak belirlenmiştir. Penisiline dirençli 12 izolatın dördü *E. faecium*, üçü *E. faecalis*, ikisi *E. durans* olarak belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen *E. gallinarum* izolatının çalışmada test edilen sekiz antibiyotikten sadece penisiline duyarlı olduğu dikkat çekmektedir. İzolatların penisiline dirençli ya da duyarlı olduğu belirlenmiş, orta derecede direnç saptanmamıştır.

İzolatların % 22'si streptomisine dirençli olarak belirlenmiştir. Streptomisine dirençli sekiz izolatın dördünün *E. faecalis*, ikisinin *E. faecium*, birinin *E. gallinarum*, birinin *E. durans* olduğu saptanmıştır. Streptomisine orta derecede dirençli beş izolatın ikisi *E. faecalis*, ikisi *E. faecium*, biri *E. durans* olarak belirlenmiştir.

Çalışmadan izole edilen izolatların % 55,5'i vankomisine direnç göstermiştir. Vankomisine direnç gösteren 20 izolatın 15'i *E. faecalis*, ikisi *E. faecium*, ikisi *E. durans*, biri *E. gallinarum* olarak belirlenmiştir. Vankomisine orta derecede

dirençli yedi izolatın dördünün *E. faecium*, ikisinin *E. faecalis* olduğu saptanmıştır. İzolatlardan birinin çalışma kapsamında test edilen antibiyotiklerden sadece vankomisine karşı dirençli olduğu dikkati çekmektedir.

İzolatların linezolid antibiyotiğine olan dirençleri % 36'dır. Linezolid dirençli 13 izolatın yedisi *E. faecalis*, ikisi *E. faecium*, ikisi *E. durans*, biri *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Linezolid orta derecede dirençli 13 izolatın ise yedisi *E. faecalis*, dördü *E. faecium*, biri *E. durans* olarak belirlenmiştir.

İzolatların % 75'i kinupristin/dalfopristin antibiyotiğine karşı direnç göstermiştir. Çalışma izolatlarının en fazla direnç gösterdiği antibiyotik kinupristin/dalfopristindir. Çalışmada bu antibiyotiğe dirençli 27 izolatın 15'i *E. faecalis*, dördü *E. faecium*, dördü *E. durans*, biri ise *E. gallinarum* olarak belirlenmiştir. Kinupristin/dalfopristine orta derecede dirençli üç izolatın ise tamamı *E. faecium* izolatlarından oluşmaktadır. İzolatların tür bazında antibiyotiklere direnç profilleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. İzolatların tür bazında antibiyotiklere direnç profilleri

İzolat no	TÜR	E	C	CN	P	S	VA	LZD	QD
3	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	S	S	R	R	R
4	<i>E. faecalis</i>	I	S	S	S	S	R	I	R
9	ND	R	I	S	S	S	R	I	R
10	<i>E. faecalis</i>	I	S	S	S	I	R	R	R
17	<i>E. faecium</i>	I	I	S	S	S	R	I	R
19B	<i>E. faecium</i>	I	S	S	S	S	I	I	I
23	<i>E. faecium</i>	I	I	S	S	I	I	I	I
31	<i>E. faecalis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R
54	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	S	S	R	I	R
56	<i>E. faecium</i>	R	I	S	R	R	S	S	R
65	<i>E. faecium</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
66	<i>E. faecium</i>	R	I	S	S	S	R	I	R
74	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	S	S	R	S	R
76	<i>E. faecalis</i>	R	R	R	S	R	R	I	R
78	<i>E. faecium</i>	I	I	I	S	S	I	R	S
79	<i>E. faecium</i>	R	R	S	R	R	S	S	R
80B	ND	R	R	I	R	S	S	S	R
82	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	S	R	R	R	R
83	<i>E. faecalis</i>	R	R	S	S	I	I	R	R
84	<i>E. casseliflavus</i>	I	S	S	S	S	S	S	S
85	ND	R	I	S	R	S	S	S	S
86	<i>E. durans</i>	R	I	I	S	I	S	R	R
88	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	S	R	R	I	R
89	<i>E. durans</i>	R	R	R	R	R	R	R	R
94	<i>E. durans</i>	R	I	I	S	S	R	I	R
95	<i>E. durans</i>	I	S	S	R	S	S	S	R
100	<i>E. faecium</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
103	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	S	S	R	I	R
105	<i>E. faecalis</i>	I	I	S	R	S	R	I	R
106	<i>E. faecalis</i>	R	S	S	S	S	R	R	R
109A	<i>E. faecalis</i>	R	I	I	S	R	R	R	R
110A	<i>E. faecalis</i>	R	I	S	R	S	R	S	R
111A	<i>E. gallinarum</i>	R	R	R	S	R	R	R	R
114	<i>E. faecium</i>	R	R	S	R	I	I	R	I
116	ND	R	S	S	R	S	I	R	R
117A	<i>E. faecalis</i>	R	S	S	R	S	I	I	S

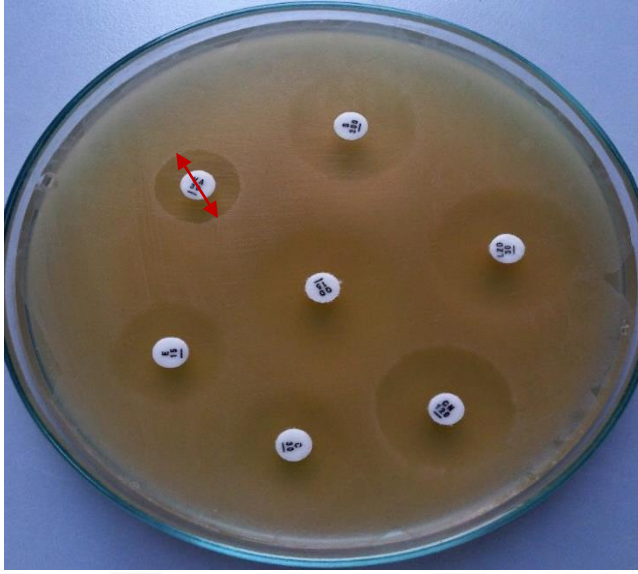
E: Eritromisin, C: Kloramfenikol, CN: Gentamisin, P: Penisilin, S: Streptomisin, VA: Vankomisin, LZD: Linezolid, QD: Kinupristin/dalfopristin, R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı; ND: saptanamamıştır

Tür bazında bakıldığında identifiye edilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. durans* izolatlarının antibiyotik dirençlilik durumları farklılık göstermektedir. *E. faecalis* izolatlarının 15 (% 94)'i kinupristin/dalfopristine, 14 (% 87,5)'ü vankomisine, 13 (% 81)'ü eritromisine, yedisi (% 44) linezolide, dördü (% 25) streptomisine, üçü (% 18) kloramfenikole, üçü (% 18) penisiline dirençli iken, sadece biri (% 6) gentamisine direnç göstermiştir. *E. faecalis* izolatlarının tamamının vankomisin ve eritromisine dirençli ya da orta derecede dirençli olduğu dikkat çekmektedir.

E. faecium izolatlarından dördünün (% 40) kinupristin/dalfopristine, üçünün (% 30) kloramfenikole, ikisinin (% 20) streptomisine, ikisinin (% 20) vankomisine, ikisinin (% 20) linezolide dirençli olduğu saptanmıştır. *E. faecium* izolatlarının tamamının eritromisine dirençli ya da orta derecede dirençli olduğu dikkat çekmektedir. *E. faecium* izolatlarından yalnızca biri (% 10) gentamisine orta derecede dirençliyken diğer *E. faecium* izolatlarının hepsinin gentamisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. penisiline orta derecede direnç gösteren izolat olmadığı, *E. faecium* izolatlarının dördünün (% 40) penisiline dirençli diğerlerinin ise duyarlı olduğu görülmektedir.

E. durans izolatlarının tamamının kinupristin/dalfopristine dirençli olduğu, yine tüm *E. durans* izolatlarının eritromisine dirençli veya orta derecede dirençli olduğu dikkat çekmektedir. *E. durans* izolatlarından birinin (% 25) çalışmada test edilen tüm antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. *E. durans* izolatlarının üçünün (% 75) kloramfenikol, gentamisin ve linezolid antibiyotiklerine, ikisinin (% 50) ise penisilin, streptomisin ve vankomisine dirençli veya orta derecede dirençli olduğu saptanmıştır.

Çalışmadan izole edilen *E. casseliflavus* izolatının sadece eritromisine orta derecede dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu saptanmıştır. *E. gallinarum* izolatının ise penisilin hariç tüm antibiyotiklere dirençli olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 3.6. Disk difüzyon yöntemi ile izolatlarda belirlenen vankomisin (VA-30) direnci

3.4. E-Test Yöntemi ile Vankomisin İzolatlarına Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Vankomisine direnç gösteren 20 izolat Mueller-Hinton Agar yüzeyine svab tekniği ile yayılarak, agar yüzeyine vankomisin içeren E-test şeritleri yerleştirilmiş, inkübasyon sonrası MİK değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).



Şekil 3.7. İzolatlara ait E test (MİK: 4 µg/ml)



Şekil 3.8. İzolatlara ait E test (MİK: 256 µg/ml üzeri)

MİK değeri CLSI standartlarına göre vankomisin dirençli enterokoklar için ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$, vankomisin duyarlı enterokoklar için ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak kabul edilmiştir. Vankomisine dirençli olduğu belirlenen 20 *Enterococcus* spp. izolatından üçünün MİK değerinin (% 15) 8 $\mu\text{g/ml}$, 13'ünün (% 65) 4 $\mu\text{g/ml}$, birinin (% 5) 2 $\mu\text{g/ml}$, ikisinin (%10) 1 $\mu\text{g/ml}$, bir izolatın ise vankomisine tamamen dirençli olduğu belirlenmiştir. CLSI standartlarına göre belirlenen MİK değerlerine göre dirençli ve duyarlı olan VRE izolatların sayısı Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. CLSI standartlarına göre belirlenen MİK değerlerine göre dirençli ve duyarlı olan VRE izolatların sayısı

MİK değeri ($\mu\text{g/ml}$)	Dirençlilik durumu	İzolat sayısı
≥ 32	R	1
8-16	I	3
≤ 4	S	16

R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı

Enterococcus spp. izolatlarının 20'si (% 55,5) vankomisine fenotipik olarak direnç gösterirken, dokuzunun vankomisine genotipik olarak dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan altısının (% 16,7) *vanA* geni, üçünün (% 8,3) *vanB* geni, bir izolatın ise hem *vanA* hem *vanB* genleri yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. *VanA* ve *vanB* genlerinin izole edildiği toplam dokuz izolatın tamamı *E. faecalis* olarak belirlenmiştir.

İzolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan analiz sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. izolatlarının panelde bulunan sekiz antibiyotiğe yüksek oranda dirençli ve/veya orta düzeyde dirençli oldukları dikkati çekmektedir. İzolatların belirlenen antibiyotik direnç profillerine göre, 36 izolatın 26'sinin (% 72,2) üç ve üzeri, yedisinin (% 19,4) beş ve üzeri, birinin (% 2,8) ise tüm antibiyotiklere dirençli oldukları saptanmıştır. *Enterococcus* spp. izolatlarından % 55,5'inin vankomisine karşı dirençli olduğu saptanmıştır. İzolatların % 70 ve üzerinde bir oranla eritromisin ve kinupristin/dalfopristine dirençli oldukları belirlenmiştir. Konuyla ilgili literatürler incelendiğinde, çalışma bulgularındakilere benzer ve aynı

gruplardaki antibiyotiklere karşı direnç profillerine sahip oldukları görülmüştür (Messi ve ark., 2006; Pesavento ve ark., 2014 ve Trivedi ve ark., 2011).

Çalışmada fenotipik olarak vankomisine dirençli ya da orta derecede dirençli olduğu saptanan tüm izolatlarda MİK değerleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla yapılan E-test sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. izolatlarından birinin (% 5) MİK değerinin 256 µg/ml'nin üzerinde olduğu yani yüksek seviyede vankomisin direnci (MİK: 64 – 128 µg/ml) gösterdiği belirlenmiştir.

VanB geni pozitif izolatların ikisi vankomisine dirençli iken, birinde vankomisine orta derecede fenotipik direnç görülmüştür. Fakat tüm *vanB* izolatlarının vankomisine karşı MİK değeri 4 µg/ml olarak belirlenmiştir. *VanA* geni saptanan izolatların ikisinin MİK değeri 8 µg/ml iken, dördünün MİK değeri 4 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Çalışmadaki tüm antibiyotiklere direnç gösteren izolatın vankomisine tamamen dirençli olduğu görülmektedir. Bu izolat dışındaki tüm izolatlarda 1-8 µg/ml arasında MİK değeri saptanmıştır. Vankomisine dirençli ya da orta derecede dirençli olduğu saptanan diğer 26 izolatın birinde 1 µg/ml, ikisinde 2 µg/ml, 18'inde 4 µg/ml, dördünde ise 8 µg/ml MİK değeri belirlenmiştir.

VanA geni pozitif izolatların tamamının vankomisin ve kinupristin/dalfopristine dirençli fakat penisiline ve gentamisine duyarlı olduğu saptanmıştır. Yalnızca bir *vanA* geni pozitif izolat streptomisine orta derecede direnç göstermiş, diğer *vanA* pozitif izolatların streptomisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Yine tüm *vanA* geni pozitif izolatlar eritromisine dirençli veya orta derece dirençlidir.

VanB geni pozitif izolatların tamamının eritromisin ve kinupristin/dalfopristine dirençli olduğu, yine tüm *vanB* geni pozitif izolatların kloramfenikol, vankomisin ve

linezolid antibiyotiklerine dirençli oldukları dikkat çekmektedir. Tüm *vanB* geni pozitif izolatlar gentamisin ve penisiline duyarlılık göstermiştir.



4. TARTIŞMA

Tavuk etlerinde dünya genelinde yapılan çalışma sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. prevalansının oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu durumun özellikle yetersiz kesim hijyenine bağlı karkasların dışkı ve bağırsak içeriği ile kontamine olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalara göre en sık rastlanan türlerin başta *E. faecalis* ve *E. faecium* olmak üzere *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* olduğu rapor edilmektedir (Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010; Lemcke ve Bülte, 2000; Messi ve ark., 2006; Miranda ve ark., 2007 ve Robredo ve ark., 2000).

Çalışma verilerine paralel olarak, Krocko ve ark. (2007) tarafından 110 et numunesinde *Enterococcus* spp. prevalansını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 15 çiğ tavuk numunesinin % 19'unun *Enterococcus* spp. ile kontamine olduğu, *Enterococcus* spp. izolatlarının % 39'u *E. faecium*, % 23'ü *E. faecalis*, % 15'i *E. casseliflavus*, % 4'ü *E. durans* olarak belirlenmiştir. İzolatların % 44'ünün ampisiline, tüm izolatların ise tetrasikline dirençli olduğu belirlenmiştir. *E. casseliflavus* izolatlarından birisinin tetrasiklin, eritromisin ve vankomisin antibiyotiklerinin üçüne birden dirençli olduğu saptanmıştır. Yine antibiyotik direnç profilleri çalışmadan elde edilen verilerle paralellik göstermektedir.

Robredo ve ark. (2000) tarafından yapılan benzer bir çalışmada 1997-1998 yılları arasında farklı marketlerden toplanan 100 tavuk eti ürünleri, haşlanmış jambon ve hindi et örneği vankomisine dirençli enterokoklar yönünden analiz edilmiş ve toplam 92 tavuk eti ürünlerinin 25'inde vankomisine dirençli enterokok izole edilmiştir. Çalışma verileriyle benzer şekilde, vankomisine dirençli enterokokların 11'i *E. durans*, 10'u *E. faecalis*, 10'u *E. faecium*, ikisi *E. hirae* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmada izole edilen verilere paralel olarak, Messi ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada 42 tavuk eti örneğinin 15'inde (% 33,3) vankomisine dirençli

enterokok izole etmişlerdir. Çalışmada elde edilen genotipik direnç profillerine benzer şekilde vankomisine dirençli enterokokların tamamında değil, yalnızca altısında *vanA* ya da *vanB* geni izole edilmiştir. İzolatların dördünde (% 8,9) *vanA*, ikisinde (% 4,4) *vanB* geni izole edilmiştir.

Yine Jung ve ark. (2007) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise 2003 yılının Mart-Kasım ayları arasında Kore'nin çeşitli bölgelerinden 100 kanatlı eti 50 domuz eti ve 50 sığır eti örneği toplanmıştır. Toplam 100 kanatlı eti örneğinin 44'ü ve 50 sığır eti örneğinin biri *vanA* pozitif olarak izole edilmiştir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada 30 sığır eti, 26 tavuk, 24 domuz, 16 hindi ve 4'ü kuzu eti olmak üzere analiz edilen 100 örnekte enterokok varlığı ve izolatların antibiyotik direnci araştırılmıştır. Örneklerden elde edilen toplam 45 *Enterococcus* spp. izolatının 17'si tavuk, 12'si sığır, sekizi domuz, beş, hindi ve üçü domuz eti örneğine ait olduğu tespit edilmiştir. *Enterococcus* spp. izolatlarının 29'u vankomisine dirençli ve 30'u teikoplanine dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışma verileri ile kıyaslandığında VRE izolatlarının daha yüksek oranda elde edildiği görülmektedir. VRE izolatlarının 13'ünün tavuk eti, altısının sığır eti, beşinin domuz eti, üçünün hindi eti ve ikisinin kuzu eti örnekleri oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen enterokok türleri dağılımı çalışmadaki verilerle benzerlik göstermektedir. *Enterococcus* spp. izolatlarının 16'sının *E. faecium*, 15'inin *E. faecalis*, üçünün *E. gallinarum*, üçünün *E. durans*, ikisinin *E. casseliflavus* izolatları oldukları belirlenmiş, geri kalan altı izolatın türleri belirlenememiştir (Pavia ve ark., 2000).

Aynı çalışmada 29 VRE izolatının 12'sinin *E. faecium*, altısının *E. faecalis*, üçünün *E. gallinarum*, ikisinin *E. durans*, birinin *E. casseliflavus* izolatı olduğu saptanmıştır. *Enterococcus* spp. izolatlarının % 17,8'inin ampisiline, % 88,8'unun metisiline, % 84,4'ünün tetrasikline, % 55,6'sının siprofloksasine, % 42,2'sinin kloramfenikole, % 15,6'sının rifampine, % 31,1'inin trimetoprim-sulfametoksazole dirençli oldukları belirlenmiştir. Ortak olarak direnç profilleri değerlendirilen antibiyotik grupları kıyaslandığında, direnç profillerinin daha yüksek oranda belirlendiği dikkat çekmektedir (Pavia ve ark., 2000).

Guerrero-Ramos ve ark. (2016) tarafından İspanya’da yapılan bir diğer çalışmada, 80’i hindi ve tavuk, 40’ı domuz ve 40’ı sığır eti örneği olmak üzere toplam 160 örnek VRE bakımından incelendiği bildirilmiştir. Çalışma verilerinden düşük oranda VRE prevelansı elde edildiği görülmektedir. Tüm örneklerin 38’inin (% 23,8) VRE izolatı olduğu belirlenmiştir. VRE izolatlarının ise 30’unun kanatlı eti örneğine, altısının domuz eti örneğine, ikisinin sığır eti örneğine ait olduğu belirlenmiştir. Tür bazında bakıldığında, çalışmadaki verilerden farklı olarak yüksek oranda *E. hirae* izolatı belirlendiği görülmektedir. VRE izolatlarının 14’ünün *E. faecium*, 10’unun *E. durans*, yedisinin *E. hirae*, beşinin *E. gallinarum*, ikisinin *E. casseliflavus* olduğu PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Kanatlı eti örneklerinden izole edilen 30 (hindi ve tavuk) izolatın 10’unun *E. faecium*, dokuzunun *E. durans*, altısının *E. hirae*, üçünün *E. gallinarum*, ikisinin *E. casseliflavus* izolatları olduğu belirlenmiştir. Çalışmadakinden farklı olarak fenotipik ve genotipik direnç profilleri oldukça benzerlik göstermektedir. Elde edilen toplam 38 VRE izolatının 27’sinin *vanA* genine, birinin *vanB* genine, yedisinin *vanC₁* genine, ikisinin *vanC_{2/3}* genine sahip oldukları belirtilmektedir.

Aynı çalışmada, 27 *vanA* genine sahip *Enterococcus* spp. izolatının 10’unun *E. faecium*, 10’unun *E. durans* ve yedisinin ise *E. hirae* olduğu doğrulanmıştır. *VanA* pozitif *E. faecium* izolatlarının yedisinin kanatlı eti, ikisinin domuz eti, birinin sığır eti örneklerine ait olduğu belirlenmiştir. *VanA* pozitif *E. durans* izolatlarının ise dokuzunun kanatlı eti, birinin domuz eti örneğine ait olduğu belirlenmiştir. *VanB* geni ise sadece bir kanatlı eti orijinli *E. faecium* izolatından izole edilmiştir. Yedi *vanC₁* geni pozitif *E. gallinarum* izolatının; üçünün kanatlı eti, birinin domuz eti ve bir diğerinin sığır eti örneğine ait olduğu saptanmıştır. *VanC_{2/3}* geni ise iki kanatlı eti orijinli *E. casseliflavus* izolatından elde edilmiştir. Benzer olarak VRE izolatlarının antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Guerrero-Ramos ve ark., 2016).

Danimarka’da 2005-2006 yılları arasında yapılan bir çalışmada ise 2209 tavuk eti ve 907 hindi eti olmak üzere toplam 3116 kanatlı eti örneği vankomisin dirençli *E. faecalis* yönünden incelenmiştir. Hindi eti izolatlarının üçünde (% 0,7)

vankomisin dirençli *E. faecalis* izole edilmiş fakat tavuk eti izolatlarından vankomisin dirençli *E. faecalis* izole edilememiştir. Çalışma verileri ile kıyaslandığında oldukça düşük oranda VRE izole edildiği dikkat çekmektedir (Agero ve ark., 2008).

Sacramento ve ark (2016) Brezilya'da gerçekleştirdikleri bir çalışmada, perakende olarak satışa sunulan 542 tavuk eti örneğinin 535'ini (% 98,7) *Enterococcus* spp. yönünden pozitif bulmuştur. Çalışma verileri ile kıyaslandığında tavuk eti örneklerinde oldukça yüksek oranda enterokok kontaminasyonu dikkat çekmektedir. Yine çalışma verilerinden farklı olarak, izolatların tür bazında dağılımı oldukça farklılık göstermektedir. *Enterococcus* spp. izolatlarının % 61,4'ü *E. faecalis*, % 28,7'si *E. gallinarum*, % 5,1'i *E. casseliflavus*, % 2,2'si ise *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada direnç profillerinin incelendiği antibiyotik grupları benzerlik göstermektedir. *Enterococcus* spp. izolatlarında vankomisin, yanı sıra gentamisin, streptomisin, teikoplanin, ampicilin, tetrasiklin, siprofloksasin, eritromisin, kloramfenikol, linezolid, kinupristin/dalfopristin, daptomisin ve tigesiklin antibiyotik dirençlerini incelemiştir. Çalışma verileriyle benzer olarak Fenotipik ve genotipik dirençler farklılık göstermektedir. Dört *E. faecalis* ve iki *E. faecium* izolatında *vanA* geni saptanmış, aynı zamanda bu izolatların çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları belirlenmiştir.

Yılmaz ve ark. (2016) tarafından 100 tavuk numunesinin antibiyotik direnç profiline bakılmış, bu çalışma verilerine benzer olarak izolatların % 96'sının penisilin, ampicilin, vankomisin, teikoplanin, eritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, kloramfenikol, gentamisin ve trimetoprim/sülfametoksazol antibiyotiklerinden en az birine dirençli oldukları belirlenmiştir. En yüksek direnç profilleri sırasıyla tetrasiklin, eritromisin, siprofloksasin ve trimetoprim/sülfametoksazol antibiyotiklerine karşı % 89, % 59, % 35 ve % 34 oranlarında saptanmıştır. Bir tavuk izolatında kloramfenikol hariç test edilen tüm antibiyotiklere karşı direnç belirlenirken, bu çalışmada ise tüm antibiyotiklere direnç gösteren bir izolat elde edilmiştir. Aynı çalışmada, izolatların % 40'ında üç ve daha fazla antibiyotiğe karşı

çoklu dirence rastlanırken, bu çalışmada ise üç ve daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu direnç oranı % 64 olarak belirlenmiştir.

Kasimoğlu Doğru ve ark. (2010) tarafından yapılan başka bir araştırmada ise, 106 tavuk boyun derisi örneğinden elde edilen *E. faecium* izolatlarından % 25'inin eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve streptomisine, *E. faecalis* izolatlarının % 44'ünün ise eritromisin, tetrasiklin ve streptomisine karşı çoklu dirence sahip oldukları belirlenmiştir. *E. faecium* izolatlarının % 44'ü ve *E. faecalis* izolatlarının % 90'ının 3 ve daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direnci göstermişlerdir.

Bütün bu çalışmalarda görülen farklılıkların orijinden, coğrafik farklardan, çalışma periyodundan, örnekleme prosedürlerinden, örneklerin başlangıç kontaminasyonundan, kesimhane hijyeninden, ürünlerde oluşan çapraz kontaminasyondan ve metot farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Konuyla ilgili literatürler incelendiğinde, çalışma bulgularındakilere benzer ve aynı gruptaki antibiyotiklere karşı direnç profillerine sahip oldukları görülmüştür (Messi ve ark., 2006; Pesavento ve ark., 2014 ve Trivedi ve ark., 2011).

ABD'nin Georgia eyaletinde 2000-2001 yılları arasında yapılan bir çalışmada çeşitli et örneklerinde *Enterococcus* spp. varlığı incelenmiştir. İncelenen 396 örneğin 189'unun (% 48) *Enterococcus* spp. yönünden pozitif olduğu doğrulanmıştır. Çalışma verileri ile kıyaslandığında tavuk eti örneklerinde oldukça yüksek oranda enterokok kontaminasyonu dikkat çekmektedir. *Enterococcus* spp. pozitif izolatların 22'sinin tavuk eti, 22'sinin sığır eti, 22'sinin domuz eti, 21'inin hindi eti, ikisinin tüketime hazır gıdalardan, üçünün ise bufalo eti, devekuşu eti ve tavuk ciğeri örneklerine ait olduğu saptanmıştır. Çalışmada tavuk eti örneklerinin 21'inde (% 95), hindi eti örneklerinin 20 (% 95)'sinde, sığır eti örneklerinin 16 (% 73)'sında, domuz eti örneklerinin 15'inde (% 68), bufalo eti, devekuşu eti ve tavuk ciğeri örneklerinin birinde enterokok türleri izole edilmiştir (McGowan ve ark., 2006).

Enterokok izolatları içerisinde elde edilen baskın türün çalışma verilerinde elde edilen tür ile ortak olduğu fakat tür bazında dağılımın çalışma verilerinden

farklılık gösterdiği dikkat çekmektedir. Et örneklerinde 80 pozitif izolat sayısı ile *E. faecalis* baskın enterokok türü olarak saptanmıştır. Tavuk eti örneklerinin 13'ünün (% 62) *E. faecalis*, ikisinin (% 10) *E. durans*, ikisinin (% 10) *E. gallinarum*, ikisinin (% 10) *E. hirae*, birinin (% 5) *E. faecium* izolatları olduğu, bir izolatın ise türünün belirlenemediği bildirilmiştir. Benzer antibiyotik gruplarına ait direnç profilleri incelenmiş, çeşitli et örneklerinden izole edilen *E. faecalis* izolatlarının 41'inin basitrasın, ikisinin kloramfenikol, ikisinin siprofloksasin, 12'sinin eritromisin, üçünün flavomisin, 10'unun gentamisin, 20'sinin kanamisin, 53'ünün linkomisin, birinin penisilin, 24'ünün streptomisin, 54'ünün sinersid, 37'sinin tetrasiklin, 13'ünün tilosin dirençli oldukları belirtilmiştir. Yine et örneklerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarının ise dördünün basitrasın, ikisinin siprofloksasin, dördünün flavomisin, birinin gentamisin, dördünün kanamisin, üçünün linkomisin, ikisinin nitrofurantoin, birinin penisilin, ikisinin streptomisin, üçünün sinersid, ikisinin tetrasiklin, birinin tilosin dirençli oldukları bildirilmiştir (McGowan ve ark., 2006).

Miranda ve ark. (2007) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, 30'unun konvansiyonel, 30'unun organik tavuk eti 30'unun ise hindi eti örneklerinden oluştuğu belirtilen toplam 90 kanatlı eti örneği *Enterococcus* spp. yönünden incelenmiş, izolatların antibiyotik direnç profilleri değerlendirilmiştir. Yine 60'ının konvansiyonel, 60'ının organik tavuk eti ve 60'ının hindi eti örneğinden izole edildiği belirtilen toplam 180 *Enterococcus* spp. izolatının disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir. Elde edilen enterokok tür dağılımı çalışma verilerinden oldukça farklılık göstermektedir. Konvansiyonel tavuk eti izolatlarının % 58,3'ünün *E. durans*, % 21,7'sinin *E. faecalis*, % 1,7'sinin *E. avium* türlerine ait oldukları saptanmış, yine izolatların % 1,7'sinin *Leuconostoc* spp. yönünden pozitif oldukları ve % 3,3'ünün identifiye edilemediği belirtilmiştir. Organik tavuk eti izolatlarının % 36,7'sinin *E. faecalis*, % 31,7'sinin *E. durans*, % 6,7'sinin *E. casseliflavus*, % 6,7'sinin *E. gallinarum*, % 1,7'sinin *E. faecium* türlerine ait oldukları saptanmış, yine izolatların % 3,3'ünün *Leuconostoc* spp., % 1,5'inin *Aerococcus* spp. yönünden pozitif oldukları ve % 8,3'ünün identifiye edilemediği belirtilmiştir. Hindi eti izolatlarının ise % 56,7'sinin *E. durans*, % 36,7'sinin *E. faecalis*, % 1,7'sinin *E. gallinarum* türlerine ait oldukları, % 5'nin ise *Aerococcus*

spp. yönünden pozitif oldukları saptanmıştır. Organik tavuk eti örneklerinde *E. faecalis*, hindi ve tavuk eti örneklerinde *E. durans* türlerinin en baskın enterokok türü olduğu görülmektedir. Organik tavuk eti örneklerinden baskın olarak izole edilen tür, bu çalışmada elde edilen baskın tür ile benzerlik göstermektedir.

Aynı çalışmada konvensiyonel, organik tavuk ve hindi eti örneklerinden elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının ampisilin, doksisislin, ertiromisin, nitrofirantoin, siprofloksasin, kloramfenikol, eritromisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı direnç profilleri çalışmadakine benzer olarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Vankomisine karşı direnç profilleri çalışmada elde edilen verilere kıyasla oldukça düşük olarak belirlenmiştir. Organik tavuk etinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının hiçbirinin vankomisine dirençli olmadığı, % 3,3'ünün vankomisine orta derecede dirençli olduğu saptanırken, konvensiyonel tavuk eti izolatlarının % 11,7'sinin vankomisine dirençli olduğu belirtilmiştir. Hindi etinden elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının ise % 90'ının vankomisine dirençli, % 5'inin orta derecede dirençli, % 5'inin ise vankomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. Hindi etinden oldukça fazla oranda vankomisin dirençli enterokokların elde edilmesi, hindilerin kesime tabi tutulmalarına kadar geçen zamanın tavuklara oranla oldukça uzun olması ve kesim hijyeni farklılıklarıyla ilişkilendirilebilir. Konvensiyonel tavuk eti izolatlarının % 5'inin beş veya daha fazla antibiyotiğe, % 3,3'ünün dört antibiyotiğe, % 11,7'sinin üç antibiyotiğe dirençli olduğu belirtilmiştir. Organik tavuk eti izolatlarının ise % 3,3'ü üç antibiyotiğe dirençli iken % 73'ü paneldeki hiçbir antibiyotiğe direnç göstermemiştir. Hindi eti izolatlarının % 3,3'ü dört antibiyotiğe, % 6,7'si üç antibiyotiğe direnç göstermiş, % 45'i ise paneldeki hiçbir antibiyotiğe direnç göstermemiştir (Miranda ve ark., 2007). Genel antibiyotik direnç profilleri kıyaslandığında, çalışmada elde edilen çoklu antibiyotik direnç profillerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Simjee ve ark., (2002) tarafından ABD'de yapılan bir başka çalışmada ise 43'ü tavuk, 32'si hindi eti olmak üzere toplam 75 örnek *Enterococcus* spp. yönünden incelenmiştir. Örneklerden toplam 70 *Enterococcus* spp. izolatu elde edilmiş, izolatların 32'si *E. faecalis*, 33'ü *E. faecium*, dördü *E. gallinarum*, biri ise *E. hirae*

olarak identifiye edilmiştir. Kinupristin/dalfopristin antiyotiğine karşı saptanan direnç çalışma verilerindeki aynı antibiyotiğe karşı olan direnç profilleri ile benzerlik göstermektedir. Kinupristin/dalfopristine dirençli ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$) izolatların 27'sinin *E. faecium*, üçünün *E. gallinarum*, birinin ise *E. hirae* türlerine ait oldukları tespit edilirken, *E. faecalis* izolatlarının hiçbirinin kinupristin/dalfopristine dirençli olmadıkları saptanmıştır. Kinupristin/dalfopristine dirençli 27 *E. faecium* izolatının 23'ünün tavuk, dördünün ise hindi eti örneklerine ait oldukları belirlenmiştir. Kinupristin/dalfopristine dirençli dört *E. gallinarum* izolatının birinin tavuk, ikisinin hindi eti örneklerine; kinupristin/dalfopristine dirençli *E. hirae* izolatının ise tavuk eti örneğine ait oldukları tespit edilmiştir. Tavuk etinden izole edilen kinupristin/dalfopristine dirençli *E. faecium* izolatlarının % 75'inin eritromisin ve penisiline, tamamının tetrasikline dirençli oldukları belirtilmektedir. Tavuk etinden izole edilen kinupristin/dalfopristine dirençli *E. faecium* izolatlarının % 13'ünün eritromisine, % 69'unun penisiline, % 75'inin tetrasikline dirençli oldukları saptanmıştır. Hindi etinden izole edilen kinupristin/dalfopristine dirençli *E. gallinarum* izolatlarının ikisinin de eritromisin ve tetrasikline dirençli fakat penisiline duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Tavuk etinden izole edilen kinupristin/dalfopristine dirençli *E. hirae* izolatının ise tetrasikline dirençli, eritromisin ve penisiline duyarlı oldukları belirtilmiştir.

Aslam ve ark. (2012) tarafından Kanada'da yapılan bir çalışmada 206'sı tavuk, 91'i hindi, 134'ü sığır, 133'ünün domuz etine ait olduğu belirtilen toplam 564 örnek *Enterococcus* spp. yönünden incelendiği ve çalışma verilerindekinden oldukça yüksek oranda *E. faecalis* kontaminasyonu saptandığı görülmektedir. Tavuk ve hindi etlerinden izole edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının % 94'ünün, sığır eti izolatlarının % 73'ünün ve domuz eti izolatlarının % 86'sının *E. faecalis* olarak identifiye edildiği bildirilmiştir. Çalışma verileri ile kıyaslandığında *E. hirae* kontaminasyonu da farklılık göstermektedir. Sığır eti izolatlarının % 21'i, domuz eti izolatlarının % 8'i, tavuk eti izolatlarının % 2'si ise *E. hirae* olarak belirlenmiştir. Sığır ve domuz eti izolatlarının % 2'si, tavuk eti izolatlarının % 4'ünün *E. faecium* olduğu saptanmış; hindi eti izolatlarının ise hiçbirinin *E. faecium* ya da *E. hirae*

olmadığı belirlenmiştir. Tavuk eti izolatlarının *E. faecium* kontaminasyonu da çalışmada elde edilen verilerden oldukça düşüktür.

Çalışmada antibiyotik direnç profilleri belirlenen yine benzer gruptaki antibiyotiklere karşı direnç profilleri saptanmıştır. Benzer olarak eritromisine ve diğer makrolid grubu antibiyotiklere karşı direncin oldukça yüksek oranda saptandığı belirtilmiştir. Hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 28'inin, tavuk eti *E. faecalis* izolatlarının % 47'sinin, sığır eti *E. faecalis* izolatlarının % 2'si, domuz eti *E. faecalis* izolatlarının % 8'inin eritromisine dirençli oldukları bildirilmiştir. Hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 29'unun tilosine ve % 15'inin kanamisine, tavuk eti *E. faecalis* izolatlarının % 49'unun tilosine ve % 20'sinin kanamisine, tavuk eti *E. faecium* izolatlarının % 11'inin kanamisine dirençli oldukları tespit edilmiştir. Yine kinupristin/dalfopristine karşı olan direnç de çalışmada direnç profillerine paralel olarak göstermektedir. Tavuk eti *E. faecium* izolatlarının % 78'inin ve domuz eti *E. faecium* izolatlarının % 50'sinin kinupristin/dalfopristine dirençli oldukları belirlenmiştir. Toplam 91 hindi eti *E. faecalis* izolatının % 97'sinin kinupristin/dalfopristine, % 10'unun gentamisine, % 97'sinin linkomisine, % 11'inin streptomisine, % 90'ının ise tetrasikline dirençli oldukları belirlenmiştir. Yine üç ve daha fazla antibiyotiğe birden çoklu direnç saptanan izolatların yüzdesi çalışmadakilere paralellik göstermekte, hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 91'i, tavuk eti *E. faecalis* izolatlarının % 91'i, sığır eti *E. faecalis* izolatlarının % 14'ü ve domuz eti *E. faecalis* izolatlarının % 45'inin üç ve daha fazla antibiyotiğe birden dirençli oldukları tespit edilmiştir (Aslam ve ark., 2012).

Ankara bölgesinde toplam 106 tavuk boyun derisi örneğinin 83'ünden (% 78) *Enterococcus* spp. izolatları elde edilmiştir. Bu çalışmadakine kıyasla oldukça fazla enterokok kontaminasyonu saptanmış olması, tavuk boyun derisinin kesim sırasında daha çok fekal kontaminasyona maruz kalmasıyla açıklanabilir. Yine enterokok türlerinin dağılımı da bu çalışmaktan farklılık göstermiş, izolatların % 48'inin *E. faecium*, % 23'ünün *E. durans*, % 19'unun *E. faecalis*, % 6'sının *E. gallinarum*, % 1'inin *E. hirae*, % 1'inin *E. mundtii* ve % 1'inin *E. casseliflavus* olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada antibiyotik direnç profilleri incelenen yine benzer gruptaki

antibiyotiklere karşı direnç profilleri belirlenmiş, benzer sonuçlar elde edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarının tümünün ve *E. faecium* izolatlarının % 68'inin streptomisine, *E. faecalis* izolatlarının % 31'inin ve *E. faecium* izolatlarının % 21'inin gentamisine dirençli oldukları belirlenmiştir. *E. faecium* izolatlarından % 25'inin eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve streptomisine, *E. faecalis* izolatlarının % 44'ünün ise eritromisin, tetrasiklin ve streptomisine karşı çoklu dirence sahip oldukları belirlenmiştir. *E. faecium* izolatlarının % 44'ü ve *E. faecalis* izolatlarının % 90'ının üç ve daha fazla antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direnci göstermişlerdir. Çalışmadakinden farklı olarak, izolatların hiçbirinde *vanA* veya *vanB* geni saptanamamıştır (Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010).



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Enterokoklar çevrede sıklıkla bulunmaları, pH, tuz ve sıcaklığa karşı olan yüksek dirençleri dolayısıyla gıda üretimi sırasında inhibe olmayarak üretimin her aşamasında kontaminasyona sebep olabilmektedirler. Bu nedenle enterokokların gıdalarda bulunmaları, uygun olmayan üretim koşullarının ve fekal kontaminasyonun indikatörüdür. Gıda kaynaklı enterokok türleri, taşıyıcıya adapte olabilen genetik materyallerini değiştirebilmeleri ve genetik materyallerini diğer mikroorganizmalara ya da diğer enterokok türlerine aktarabilmeleri nedeniyle, mevcut genomun değişmesine ve direnç genlerinin taşınmasına neden olmaktadır. Bu durum gıda kaynaklı enterokok türlerinin antibiyotik direnç genlerinin insanlara aktarılmasında oldukça önemlidir.

Vankomisine karşı direnç, gıda kaynaklı enterokok türleri arasında en önemli antibiyotik direnç fenotipi olarak bilinmektedir. Vankomisin de içinde bulunduğu antibiyotik grubu olan glikopeptidler, çoklu antibiyotik direncine sahip türlere ya da ampisilin, penisilin gibi antibiyotiklere karşı alerjisi olan hastaların tedavisinde kullanıldıklarından dolayı klinik önemleri büyüktür. Direnç genlerinin gıdalar aracılığıyla insanlara aktarılması da bu durumun önemini ciddileştirmektedir. Bu nedenle vankomisine dirençli enterokoklar halk sağlığı açısından global bir tehdit oluşturmaktadır.

Dünya çapında nozokomiyal infeksiyonların yanı sıra gıda kaynaklı infeksiyonların da önemli bir etkeni olarak bilinen *Enterococcus* spp.'nin Türkiye'de tavuk etlerindeki durumunun belirlenmesi, gıda güvenliği ve halk sağlığı boyutu ile ilgili bilimsel veri sağlanması amacıyla yapılan bu çalışma, vankomisin dirençli enterokokların tavuk etlerindeki kontrolüne yönelik ulusal veriler sağlamaktadır.

Çalışma verileri tavuk etlerinde vankomisin dirençli enterokokların varlığını araştıran az sayıdaki çalışmalara katkıda bulunarak Türkiye'de klinik izolatlarda nozokomiyal infeksiyonlara neden olan vankomisin dirençli *Enterococcus* spp.

izolasyon ve identifikasyonu üzerine yapılan çalışmaların yanı sıra, VRE infeksiyonlarının önüne geçebilmek için gerekli önlemlerin alınmasını sağlayacaktır. İzolatların PCR metodu ile tiplendirilmelerinin yapılması ile elde edilen vankomisin dirençli suşların, yapılan farklı çalışmalarda izole edilen potansiyel insan izolatları ile karşılaştırılması moleküler epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir veri sağlayacaktır.

Özellikle hastane infeksiyonları açısından önem taşıyan vankomisin dirençli enterokoklarla kontamine olmuş tavuk etlerinde varlığının ortaya çıkarılmasıyla multidisipliner bir çalışma ortamı oluşturularak oluşabilecek infeksiyonları önlemek için ulusal kalıntı izleme programları ile kontrol stratejilerine katkıda bulunacaktır.

Vankomisin direncine sahip enterokok infeksiyonların sağaltımı halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Enterokokal infeksiyonların tedavisi amacıyla gerekli antibiyogram testleri yapıldıktan sonra antibiyotik direncin gelişip gelişmemesine bağlı olarak hareket edilmelidir. VRE infeksiyonlarının tedavisi için son yıllarda VRE'ye karşı linezolidten dört kat daha düşük MIC değerine sahip gelecek nesil bir antibiyotik olan tedizolidin parenteral veya oral yolla kullanımı *vanA* ve *vanB* direncine sahip VRE infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Tedizolid, *cfr* genindeki mutasyonla linezolid dirençli izolatlar karşı etkinlik göstermektedir.

Çalışmada, Ankara'daki marketlerde olarak satışa sunulan 120 adet tavuk kuşbaşı örneklerinden klasik kültür yöntemiyle *Enterococcus* spp. izolasyonu ve biyokimyasal testler kullanılarak identifikasyonu yapılmış, izolatlar PCR analizi ile doğrulanmış, pozitif bulunan örneklerin multipleks PCR ile *Enterococcus* türlerinin doğrulanması yapılmıştır. Çalışmada tespit edilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* izolatlarının CLSI standartlarına göre eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, penisilin, streptomisin, vankomisin, linezolid, kinupristin-dalfopristin antibiyotiklerine karşı direnç profilleri tespit edilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak tanımlanan türler *vanA* ve *vanB* direnç fenotipleri yönünden multipleks PCR analizi yapılarak moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Vankomisine direnç

ve orta düzeyde direnç gösteren tüm suşlarda E-test yapılarak MİK değerleri belirlenmiştir.

Çalışma verileri dünya genelinde tavuk etlerinde *Enterococcus* spp. prevalansını belirlemeye yönelik yapılan çalışma sonuçlarına paralellik göstermektedir. Yine dünya genelinde yapılan çalışmalara göre en sık rastlanan türlerin *E. faecalis* ve *E. faecium* olması çalışma verileriyle örtüşmektedir. Elde edilen veriler Türkiye'deki mevcut literatür bilgisine katkıda bulunmakta, aynı zamanda gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından değerlendirilerek daha sonra yapılacak çalışmalara katkı sağlamaktadır.

Çalışmada multipleks PCR ile elde edilen identifikasyon sonuçlarının biyokimyasal test sonuçlarıyla paralel olması, PCR'ın *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak identifiye edilmesi için etkin ve hızlı bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra, multipleks PCR optimizasyonunun geliştirilebilmesi için daha fazla çalışma yapılabileceği düşünülmektedir.

Yüksek seviyede vankomisin direncinin *Enterococcus* spp. izolatlarından *Staphylococcus aureus* izolatlarına *in vivo* ve *in vitro* ortamda aktarılabilirdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Çalışma sonuçları da dikkate alındığında, vankomisinin direncinin başta *S. aureus* olmak üzere diğer patojenlere aktarılabilmesi ve insanlardan elde edilebilecek potansiyel izolatlar ile ilgili kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara gereksinim duyulduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmadan elde edilen bulgular incelendiğinde tavuk kuşbaşı örneklerinin önemli düzeyde *Enterococcus* spp. ile kontamine oldukları, izolatların vankomisine ve diğer antibiyotiklere karşı yüksek seviyede direnç gösterdikleri saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların ulusal kalıntı izleme planı kapsamında önem taşıyacağı düşünülmektedir. Özellikle vankomisine dirençli enterokokların halk sağlığı açısından büyük önem taşıması nedeniyle, çiftlikten sofraya gıda güvenliği kapsamında *Enterococcus* spp. ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

ÖZET

Çalışmada, Ankara'daki marketlerde taze olarak satışa sunulan tavuk kuşbaşı örneklerinden klasik kültür yöntemiyle *Enterococcus* spp. izolasyonu ve biyokimyasal testler kullanılarak identifikasyonu, izolatların PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi ile doğrulanması, pozitif bulunan izolatların multipleks PCR ile identifikasyonu, *Enterococcus* spp. izolatlarının eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, penisilin, streptomisin, vankomisin, linezolid, kinupristin-dalfopristin olmak üzere 8 farklı antibiyotik diski kullanılarak antibiyotik direnç profillerinin Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) standartlarına göre saptanması, *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak identifiye edilen türlerin *vanA* ve *vanB* direnç fenotipleri yönünden multipleks PCR analizi yapılarak moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi, vankomisine direnç gösteren tüm suşlarda E test yapılarak MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu kapsamda 120 tavuk kuşbaşı örneği analiz edilmiş ve örneklerin 36'sının (% 30) *Enterococcus* spp. ile kontamine olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. olarak belirlenen 36 izolatın 16'sı (% 44,4) *E. faecalis*, 10'u (% 27,8) *E. faecium*, dördü (%11,1) *E. durans*, biri (% 2,8) *E. gallinarum*, biri ise (% 2,8) *E. casseliflavus* olarak identifiye edilmiş, dört izolat identifiye edilememiştir.

Enterococcus spp. olarak belirlenen 36 izolatın altısının (% 16,7) *vanA*, üçünün (% 8,3) *vanB* geni yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. *VanA* ve *vanB* genlerinin izole edildiği toplam dokuz izolatın tamamının *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlardan bir tanesinin *vanA* ve *vanB* genlerinin ikisine de sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatların belirlenen antibiyotik direnç profillerine göre, 36 izolatın 26'sının (% 72,2) üç ve üzeri, 7'sinin (% 19,4) beş ve üzeri, birinin (% 2,8) ise tüm antibiyotiklere dirençli oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Vankomisin dirençli enterokok (VRE), multipleks PCR, antibiyotik direnç, *E. faecalis*, *E. faecium*, *vanA*, *vanB*

SUMMARY

The objectives of this study were to isolate and identify *Enterococcus* spp. from chicken retail meat samples collected from Ankara markets by classical culture method and using biochemical tests, to verify the isolates by PCR (Polymerase Chain Reaction), to identify the *Enterococcus* spp. isolates by multiplex PCR, to evaluate the antibiotic resistance profiles of the verified *Enterococcus* spp. isolates with eight different antibiotics including erythromycin, chloramphenicol, gentamicin, penicillin, streptomycin, vancomycin, linezolid, quinupristin-dalfopristin according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standards, to determine the molecular characterization of the species identified as *E. faecalis* and *E. faecium* for *vanA* and *vanB* resistance phenotypes with multiplex PCR, to verify of positive isolates' species with multiplex PCR, to determine MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values of all the isolates determined as vancomycin resistant by E test.

For this purpose, 120 chicken retail meat samples were analyzed, and 36 (% 30) of the samples were detected as *Enterococcus* spp. According to the results, 16 (% 39,7) were isolated as *E. faecalis*, 10 (% 39,7) were isolated as *E. faecium*, four were isolated (%11,1) *E. durans*, one (% 2,8) was isolated as *E. gallinarum*, one (% 2,8) was isolated as *E. casseliflavus* and four of the isolates couldn't be identified.

Among 36 isolates confirmed as *Enterococcus* spp., six isolates (% 16,7) were detected as *vanA* positive, three isolates (% 26,9) were detected as *vanB* positive. All of the nine *vanA* and *vanB* positive isolates were confirmed as *E. faecalis*. One of these isolates contained both *vanA* and *vanB* genes. According to antibiotic resistance profiles, 26 isolates (% 72,2) were resistant to three and above, seven isolates (% 19,4) were resistant to five and above, one isolate (% 2,8) was resistant to all of the eight antibiotics out of 36 isolates.

Keywords: Vancomycin resistant Enterococci (VRE), multiplex PCR, antibiotic resistance, *E. faecalis*, *E. faecium*, *vanA*, *vanB*

KAYNAKLAR

- AARESTRUP FM (1995). Occurance of glucopeptides resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist*, **1**: 255-257.
- ABOUELNAGA M, LAMAS A, QUINTELA-BALUJA M, M OSMAN, MIRANDA JM, CEPEDA A, FRANCO CM (2016). Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in Enterococci isolated from fermented and unfermented foods. *Ann Microbiol*, **66** (2): 577–585.
- AGERSØY, LESTERCH, PORSEBOLJ, ØRSTED I, EMBORG HD, OLSEN KEP, JENSEN LB, HEUER OE, MØLLER NF, AARESTRUP FM, HAMMERUM AM (2008). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. *J Antimicrob Chemother*, **62** (4):844-845.
- AHMAD M, SMITH DG, MAHBOOB S (2002). Effect of heat treatment on stationary phase cells of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *Int J Agri Biol*, **4** (2): 234-236.
- ANDERSSON DI, HUGHES D (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev*, **35** (5): 901–911.
- ANON (1997). National surveillance of dialysis-associated diseases in the United States, 1997. Vancomycin use and vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE). Erişim adresi: [<http://www.cdc.gov/dialysis/PDFs/Dialysis97.pdf>]. Erişim tarihi: 22.12.16.
- ANON (1998). Council Regulation No: 2821/98 of 17 December, 1998 amending, as regards withdrawal of the authorization of certain antibiotics. Directive 70/524/EEC concerning additives feedingstuffs. Erişim Adresi: [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:351:0004:0008:EN:PDF>]. Erişim Tarihi: 18.08.2016.
- ANON (2002). Tebliğ No: 2002/66 Yem Katkı Ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı Ve Kullanımı Hakkında Tebliğ, Yayımlandığı Resmi Gazete: 18.12.2002-24967. Erişim Adresi: [<http://www.tarim.gov.tr/GKGM>]. Erişim Tarihi: 10.01.2017.
- ANON (2010). Antimicrobial Resistance Surveillance Program. In: FRENCH GL. (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. Erişim adresi: [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857910700030>]. Erişim tarihi: 28.11.2016.
- ANON(2011). Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31(1): 84-87, Erişim adresi: [http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf]. Erişim tarihi: 28.11.2016.

- ANON (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE). Erişim Adresi: [<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=67>]. Erişim tarihi: 22.12.2016.
- ANON (2014). Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Erişim Adresi: [http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M100S25_sample.pdf]. Erişim tarihi: 22.12.2016.
- ANON (2017a). List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Erişim Adresi: [<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>]. Erişim tarihi: 15.01.2017.
- ANON (2017b). National Center for Biotechnology Information. Nucleotide. Erişim adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>]. Erişim tarihi: 10.01.2017.
- ARIAS CA, MURRAY BE (2012). The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*, **10**: 266-278.
- ARIAS CA, PANESSO D, MCGRATH DM, QIN X, MOJICA MF, MILLER C, DIAZ L, TRAN TT, RINCON S, BARBU EM, REYES J, ROH JH, LOBOS E, SODERGREN E, PASQUALINI R, ARAP W, QUINN JP, SHAMOO Y, MURRAY BE, WEINSTOCK GM (2011). Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in Enterococci. *N Engl J Med*, **365**: 892-900.
- ASLAM M, DIARRA MS, CHECKLEY S, BOHAYCHUKV, MASSON V (2012). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol*, **156** (3): 222-230.
- BARBOSA J, GIBBS PA, 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.
- BERTRAND X, MULIN B, VIEL JF, THOUVEREZ M, TALON D (2000). Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. *Food Microbiol*, **17** (5): 543-551.
- BORGEN K, SORUM M, WASTESON Y, KRUSE H (2001). *VanA* type vancomycin resistant Enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int J Food Microbiol*, **64** (1-2): 89-94.
- BROWN DFJ, BROWN NM, COOKSON BD, DUCKWORTH G, FARRINGTON M, FRENCH GL, KING L, LEWIS D, LIVERMORE DM, MACRAE B, SCOTT GM, WILLIAMS D, WOODFORD N (2006). National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance working group report to the department of health. *J Hosp Infect*, **62** (1): 1-27.
- BROWN SD, TRACZEWSKI MM (2010). Comparative in vitro antimicrobial activities of torezolid (TR-700), the active moiety of a new oxazolidinone, torezolid phosphate (TR-701), determination of tentative disk diffusion interpretive criteria, and quality control ranges. *Antimicrob Agents Chemother*, **54** (5): 2063-2069.

- BUYUKYORUK S, ND AYAZ, YE GENÇAY, BEYAZ D, KOCAK P (2014). Species distribution, molecular characteristics and vancomycin resistance gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from farmhouse cheeses in western Turkey. *Int J Dairy Technol*, **67** (1): 103-109.
- CARVALHO MGS, SHEWMAKER PL, STEIGERWALT AG, MOREY RE, SAMPSON AJ, JOYCE K, BARRETT TJ, TEIXEIRA LM, FACKLAM RR (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**: 1505-1508.
- CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA W, ZADERNOWSKA A, ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. Presented in food. *Lwt-Food Sci Technol*, **75**: 670-676.
- CHEN YS, LIN YH, PAN SF, JI SH, CHANG YC, YU CR, LIOU MS, WU HC, OTOGURO M, YANAGIDA, F, LIAO CC, CHIU CM, HUANG BQ (2013). *Enterococcus saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* subsp. nov., isolated from broccoli. *Int J Syst Evol Microbiol*, **63**: 4691-4697.
- CHENG S, MCCLESKEY FK, GRESS MJ, PETROZIELLO JM, LIU R, NAMDARI H, BENINGA K, SALMEN A, DELVECCHIO VG (1997). A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, **35**: 1248-1250.
- CHOW JW (2000). Aminoglycoside resistance in Enterococci. Special section: Antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis*, **31** (2): 586-589.
- CLEWELL DB, FRANCIA MV, FLANNAGAN SE, AN FY (2002). Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid*, **48** (3): 193-201.
- COLLINS MD, JONES D, FARROW JAE, KILPPER-BALZ R, SCHLEIFER KH (1984). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **34**: 220-223.
- COLLINS MD, FARROW JAE, JONES D (1986). *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **36**: 8-12.
- COLLINS MD, FACKLAM RR, FARROW JAE, WILLIAMSON R (1989). *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett*, **57**: 283-288.
- COLLINS MD, RODRIGUES UM, PIGOTT NE, FACKLAM RR (1991). *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett Appl Microbiol*, **12**: 95-98.
- COTTA MA, WHITEHEAD TR, FALSEN E, MOORE E, LAWSON PA (2013). Erratum to: Two novel species *Enterococcus lemanii* sp. nov. and *Enterococcus eurekaensis* sp. nov., isolated from a swine manure storage pit. *Antonie van Leeuwenhoek*, **103**: 1409-1418.
- CUNHA BA (2002). Strategies to control antibiotic resistance. *Semin Respir Infect*, **17** (3): 250-258.

- ÇETİNKAYA Y, FALK P, MAYHALL CG (2000). Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev*, **13** (4): 686–707.
- DE GRAEF EM, DEVRIESE LA, VANCANNEYT M, BAELE M, COLLINS MD, LEFEBVRE K, SWINGS J, HAESBROUCK F (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a later synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**: 1069-1074.
- DE VAUX A, LAGUERRE G, DIVIES C, PREVOST H (1998). *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int J Syst Bacteriol*, **48**: 383-387.
- DEVRIESE LA, CEYSSENS K, RODRIGUES UM, COLLINS MD (1990). *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett*, **71**: 247-252.
- DEVRIESE LA, POT B, COLLINS MD (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol*, **75**: 399 – 408.
- DIAZGRANADOS CA, ZIMMER SM, KLEIN M, JERNIGAN JA (2005). Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*, **41**(3): 327–333.
- DUTKA MALEN S, EVERS S, COURVALIN P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, **33** (1): 24-27.
- EROL İ (2007). Gıdahijyeni ve mikrobiyolojisi. In: *Enterococcus*. Ed.: İ. EROL. Pozitif Matbaacılık, Ankara. p.: 166-168.
- EVERS S, SAHM DF, COURVALIN P (1993). The *vanB* gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala: D-Ala ligases and glycopeptide-reistance proteins *vanA* and *vanC*. *Gene*, **124** (1): 143-144.
- FACKLAM RR, COLLINS MD (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. *J Clin Microbiol*, **27** (4): 731-734.
- FACKLAM RR, ELLIOT JA (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and Enterococci. *Clin Microbiol Rev*, **8** (4): 479-495.
- FARROW JAE, COLLINS MD (1985). *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int J Syst Bacteriol*, **35**: 73-75.
- FISHER K, PHILLIPS C (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol*, **155**(6): 1749-1757.
- FOLLI C, MANGIAROTTI L, FOLLONI S, ALFIERI B, GOBBO M, BERNI R, RIVETTI C (2008). Specificity of the TraA–DNA interaction in the regulation of the pPD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*. *J Mol Biol*, **380** (5): 932–945.

- FORTINA MG, RICCI G, MORA D, MANACHINI PL (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**: 1717-1721.
- FRANZ CMAP, MUSCHOLL-SILBERHORN AB, YOUSIF NMK, VANCANNEYT M, SWINGS J, HOLZAPFEL WH (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*, **67** (9): 4385-4389.
- FRENCH GL (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*, **36** (3): 3-7.
- FROLKOVA P, SVEC P, SEDLACEK I, MASLANOVA I, CERNOHLAVKOVA J, GHOSH A, ZUREK L, RADIMERSKY T, LITERAK I (2013). *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). *Int J Syst Evol Microbiol*, **63**: 3069-3074.
- GIRAFFA G (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*, **26** (2): 163-171.
- GOMES BC, ESTEVES CT, PALAZZO IC, DARINI ALC, FELIS GE, SECHI LA, FRANCO BDGM, DE MARTINIS ECP (2008). Prevalence and characterization of *enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*, **25**(5): 668-675.
- GOMEZ-GIL R, ROMERO-GOMEZ MP, GARCIA-ARIAS A, UBEDA MG, BUSSELO MS, CISTERNA R, GUTIERREZ-ALTES A, MINGORANCE J (2009). Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **65** (2): 175-179.
- GÖNCÜOĞLU M, BİLİR ORMANCI FS, KASIMOĞLU DOĞRU A (2009). Beyaz peynir üretiminde *Enterococcus faecium*'un starter kültür olarak kullanılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **56**: 249-254.
- GUERRERO MLF, GOYENECHEA A, VERDEJO C, ROBLAS RF, DE GORGOLAS M (2007). Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves: a review of clinical and prognostic factors with emphasis on hospital-acquired infections as a major determinant of outcome. *Medicine*, **86**(6): 363-377.
- GUERRERO-RAMOS E, MOLINA-GONZALEZ D, BLANCO-MORAN S, IGREJAS G, POETA P, ALONSO-CALLEJA C, CAPITA R (2016). Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant Enterococci in meat preparations. *J Food Prot*, **79** (5): 748-756.
- GÜLHANT, AKSAKAL A, EKİN İH, SAVAŞAN S, BOYNUKARA B (2006). Virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from humans and pets. *Turk J Vet Anim Sci*, **30** (5): 477-482.
- HANDWERGER S, PERLMAN DC, ALTARAC D, MCAULIFFE F (1992). Concomitant high level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of Enterococci. *Clin Infect Dis*, **14**: 655-661.
- HARBARTH S, UCKAY I (2004). Are there patients with peritonitis who require empiric therapy for *Enterococcus*? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **23** (2): 73-77.

- HARTMAN PA, DEIBEL RH, SIEVERDING LM (1992). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. In: Enterococci. 3rd Ed. Ed.:Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F., American Public Health Association, Washington. p.: 523-531.
- HUANGMB, BAKERCN, BANERJEES, TENOVERFC (1992). Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of Staphylococci, Enterococci, Campylobacter jejuni, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol*, **30** (12): 3243-3248.
- HUDDLESTON JR (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*, **7**: 167-176.
- IVANOV IT, BOYTCHIEVA S, MIHAILOVA G (1999). Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and preincubation temperature. *J Therm Biol*, **24** (4): 217-227.
- JACKSON CR, FEDORKA-CRAY PJ, BARRETT JB (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *J Clin Microbiol*, **42**: 3558-3565.
- JACOBSENBL, SKOU M, HAMMERUM AM, JENSEN LB. (1999). Horizontal Transfer of the satA Gene Encoding Streptogramin A resistance between isogenic *Enterococcus faecium* strains in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *Microb Ecol Health Dis*, **11** (4): 241-247.
- JUNG WK, LIM JY, KWON NH, KIM JM, HONG SK, KOO HC, KIM SH, PARK YH (2007). Vancomycin-resistant Enterococci from animal sources in Korea. *Int J Food Microbiol*, **113** (1): 102-107.
- KADRI Z, SPITAEELS F, CNOCKAERT M, PRAET J, EL FARRICHA O, SWINGS J, VANDAMME, P (2015). *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, **108**: 1257-1265.
- KARIYAMA R, MITSUHATA R, CHOW JW, CLEWELL DB, KUMON H (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant Enterococci. *J Clin Microbiol*, **38** (8): 3092-3095.
- KASIMOĞLU DOĞRU A, GENÇAY YE, AYAZ ND (2010). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Res Vet Sci*, **89** (2): 153-158.
- KE D, PICARD FJ, MARTINEAU F, MENARD C, ROY PH, OUELLETTE M, BERGERON MG (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J Clin Microbiol*, **37** (11): 3497-3503.
- KIM JY, SHIN NR, NA HK, HYUN DW, WHON TW, KIM PS, YUN JH, BAE JW (2013). *Enterococcus diestrammenae* sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena coreana*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **63**: 4540-4545.
- KLARE I, KONSTABEL C, BADSTUBNER D, WERNER G, WITTE W (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*, **88** (2-3): 269-290.

- KLEIN G (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of Enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol*, **88**: 123– 131.
- KLEIN G, PACK A, REUTER G (1998). Antibiotic resistance patterns of Enterococci and occurrence of vancomycin-resistant Enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 1825–1830.
- KOORT J, COENYE T, VANDAMME P, SUKURA A, BJORKROTH J (2004). *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**: 1823-1827.
- KROCKO M, CANIGOVA M, DUCKOVA V (2007). Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw pork, beef and poultry. *J Food Nutr Res*, **46** (2): 91-95.
- KUSUDA R, KAWAI K, SALATI F, BANNER CR, FRYER JL (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol*, **41**: 406-409.
- LAW-BROWN J, MEYERS PR (2003). *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the Enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **53**: 683-685.
- LECLERCQ R (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*, **24**(1): 80-84.
- LEMCKE R, BULTE M (2000). Occurrence of the vancomycin-resistant genes *VanA*, *VanB*, *VanC1*, *VanC2* and *VanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int J Food Microbiol*, **60**(2-3): 185-194.
- LI CY, TIAN F, ZHAO YD, GU CT (2014). *Enterococcus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. *Int J Syst Evol Microbiol*, **64**: 1012-1017.
- LOPEZ M, SAENZ Y, ROJO BEZARES B, MARTINEZ S, CAMPO R, RUIZ LARREA F, ZARAZAGA M, TORRES C (2009). Detection of *vanA* and *vanB2* containing Enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains CC17 and the new singleton ST425. *Int J Food Microbiol*, **133**(1-2): 172-178.
- LUCENA-PADROS H, GONZALEZ JM, CABALLERO-GUERRERO BN, RUIZ-BARBA JL, MALDONADO-BARRAGAN A (2014). *Enterococcus olivae* sp. nov., isolated from Spanish-style green-olive fermentations. *Int J Syst Evol Microbiol*, **64**: 2534-2539.
- LUDWIG W, SEEWALD E, KILPPER-BALZ R, SCHLEIFER KH, MAGRUM L, WOESE CR, FOX GE, STACKEBRANDT E (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Gen Microbiol*, **131**: 543–551.
- MACOVEI L, ZUREK L (2006). Ecology of antibiotic resistance genes: Characterization of Enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl Environ Microbiol*, **72** (6): 4028-4035.
- MANERO A, BLANCH AR (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol*, **65** (10): 4425-4430.

- MANNU L, PABAA A, DAGAA E, COMUNIANA R, ZANETTIB S, DUPRE I, SECHI LA (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol*, **88** (2-3): 291–304.
- MARTINEZ S, LOPEZ M, BERNARDO (2003). A Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol*, **37** (6): 475-481.
- MARTINEZ-MURCIA AJ, COLLINS MD (1991). *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett*, **80**: 69-74.
- McGOWAN LL, JACKSON CR, BARRETT JB, HIOTT LM, FEDORKA-CRAY PJ (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot*, **69**(12): 2976-2982.
- MESSI P, GUERRIERI E, DE NIEDERHAUSERN S, SABIA C, BONDI M (2006). Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int J Food Microbiol*, **107** (2): 218-222.
- METAN G, ZARAKOLU P, UNAL S (2005). Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. *J Hosp Infect*, **61** (2): 93–99.
- MIRANDA JM, GUARDDON M, MONDRAGON A, VAZQUEZ BI, FENTE CA, CEPEDA A, FRANCO CM (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *J Food Prot*, **70** (4): 1021-1024.
- MORANDI S, CREMONESI P, POVOLO M, BRASCA M (2012). *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol*, **62**: 1992-1996.
- MORENO MRF, SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E, DE VUYST L (2006). The role and application of Enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, **106**: 1–24.
- MOUBARECK C, BOURGEOIS N, COURVALIN P, DOUCET-POPULAIREF (2003). Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human Enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Am Soc Microbiol*, **47** (9): 2993-2996.
- MUNDY LM, SAHM DF, GILMORE M (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, **13** (4): 513-522.
- MURRAY BE (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, **3** (1): 46-65.
- MURRAYBE (1998). Diversity among multidrug-resistant Enterococci. *Synopses*, **4** (1): 37-47.
- NASER SM, VANCANNEYT M, DE GRAEF E, DEVRIESE LA, SNAUWAERT C, LEFEBVRE K, HOSTE B, SVEC P, DECOSTERE A, HAESBROUCK F, SWINGS J (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 2177-2182.

- NIEMI RM, OLLINKANGAS T, PAULIN L, SVEC P, VANDAMME P, KARKMAN A, KOSINA M, LINDSTRÖM K (2012). *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *Int J Syst Evol Microbiol*, **62**: 2169-2173.
- NOLLET L (2005). EU close to a future without growth promoters. *World Poultry*, **21** (6): 14-15.
- O'DRISCOLL T, CRANK CW (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist*, **8**: 217-230.
- PALMER KL, DANIEL A, HARDY C, SILVERMAN J, GILMORE MS (2011). Genetic basis for daptomycin resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, **55** (7): 3345-3356.
- PAVIA M, NOBILE CG, SALPIETRO L, ANGELILLO IF. (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of Enterococci in raw meat. *J Food Prot*, **63** (7): 912-915.
- PEREZ-HERNANDEZ X, MENDEZ ALVAREZ S, CLAVERIE MARTIN FA (2002). PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant Enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **42** (4): 273-277.
- PESAVENTO G, CALONICO C, DUCCI B, MAGNANINI A, LO NOSTRO A (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Control*, **41**: 1-7.
- PETERS J, MAC K, WICHMANN SCHAUER, KLEIN G, ELLERBROEK L (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of Enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol*, **88** (2-3): 311-331.
- PETSARIS O, MISZCZAK F, GICQUEL BRUNEAU M, PERRIN GUYOMARD A, HUMBERT F, PASCAL SANDERS P, LECLERCQ R (2005). Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens. *Appl Environ Microbiol*, **71** (5): 2796-2799.
- PHILIPS I, CASEWELL M, COX T, GROOT B, FRIIS C, JONES R, NIGHTINGALE C, PRESTON R, WADDELL J (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother*, **53** (1): 28-52.
- POMPEI R, BERLUTTI F, THALLER MC, INGIANNI A, CORTIS G, DAINELLI B (1992). *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of Enterococci of clinical origin. *Int J Syst Bacteriol*, **42**: 365-369.
- PSONI L, TZANETAKIS N, LITOPOULOU-TZANETAKI E (2003). Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from goat's milk. *Food Microbiol*, **20**: 575-582.
- RAHKILA R, JOHANSSON P, SADE E, BJORKROTH J (2011). Identification of Enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Appl Environ Microbiol*, **77**: 1196-1203.
- RICE LB (2001). Emergence of vancomycin-resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis*, **7** (2): 183-187.
- ROBREDO B, SINGH KV, BAQUERO F, MURRAY BE, TORRES C (2000). Vancomycin-resistant Enterococci isolated from animals and food. *Int J Food Microbiol*, **54** (3): 197-204.

- RODRIGUES U, COLLINS MD (1990). Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett*, **71**: 231-234.
- RYBAK JM, MARX K, MARTIN CA (2014). Early experience with tedizolid: clinical efficacy, pharmacodynamics, and resistance. *Pharmacotherapy*, **34** (11): 1198–1208.
- SACRAMENTO AG, ZANELLA RC, DE ALMEIDA LM, PIRES C, POPAZOGLO C, COSTA EA, CERDEIRA LT, MAMIZUKA EM, LINCOPAN N (2016). Identification of new sequence types among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* carrying the *vanA* gene in retail chicken meat. *J Glob Antimicrob Resist*, **4**: 72-73.
- SALGADO CD (2008). The risk of developing a vancomycin-resistant *Enterococcus* bloodstream infection for colonized patients. *Am J Infect Control*, **36** (10): S175. e5–e8.
- SAVAŞAN S, KAYA O, KIRKAN Ş, ÇİFTÇİ A (2008). Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **55** (2): 107-110.
- SAVAŞAN S, KIRKAN Ş, ERBAŞ G, PARIN U, ÇİFTÇİ A (2016). The determination of virulence factors among fish originated Enterococci. *Etlik Vet Microbiol Derg*, **27** (2): 98-103.
- SCHLEIFER KH, KILPPER-BALZ R (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. As *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **34**: 31-34.
- SEDLACEK I, HOLOCHOVA P, MASLANOVA I, KOSINA M, SPROER C, BRYNDOVA H, VANDAMME P, RUDOLF I, HUBALEK Z, SVEC P (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing Enterococci from the environment. *Int J Syst Evol Microbiol*, **63**: 502-510.
- SHRESTHA NK, CHUA JD, TUOHY MJ, WILSON DA, PROCOP GW, LONGWORTH DL, ISADA CM, HALL GS (2003). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: potential utility of fosfomycin. *Scand J Infect Dis*, **35**(1):12–14.
- SIEVERT DM, RICKS P, EDWARDS JR, SCHNEIDER A, PATEL J, SRINIVASAN A, KALLEN A, LIMBAGO B, FRIDKIN S (2013). National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **34**(1):1–14.
- SILVER LL (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*, **24** (1): 71–109.
- SIMJEE S, WHITE DG, MENG J, WAGNER DD, I S, ZHAO S, HAYES JR, MCDERMOTT PF (2002). Prevalence of streptogramin resistance genes among *Enterococcus* isolates recovered from retail meats in the Greater Washington DC area. *J Antimicrob Chemother*, **50** (6): 877-882.

- SISTEK V, MAHEUX AF, BOISSINOT M, BERNARD KA, CANTIN P, CLEENWERCK I, DE VOS P, BERGERON MG (2012). *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol*, **62**: 1314-1320.
- SOOD S, MALHOTRA M, DAS BK, KAPIL A (2008). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, **128**: 111-121.
- SORENSEN TL, BLOM M, MONNET DL, FRIMODT-MØLLER N, POULSEN RL, ESPERSEN F (2001). Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med*, **345** (16): 1161-1166.
- STEIN GE, CRAIG WA (2006). Tigecycline: a critical analysis. *Clin Infect Dis*, **43** (4):518-524.
- SUKONTASING S, TANASUPAWAT S, MOONMANGMEE S, LEE JS, SUZUKI K (2007). *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**: 2151-2154.
- SVEC P, DEVRIESE LA, SEDLACEK I, BAELE M, VANCANNEYT M, HAESBROUCK F, SWINGS J, DOSKAR J (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**: 1567-1574.
- SVEC P, VANCANNEYT M, DEVRIESE LA, NASER SM, SNAUWAERT C, LEFEBVRE K, HOSTE B, SWINGS J (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol*, **55**: 2183-2187.
- SVEC P, VANCANNEYT M, SEDLACEK I, NASER SM, SNAUWAERT C, LEFEBVRE K, HOSTE B, SWINGS J (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**: 577-581.
- SVEC P, VANDAMME P, BRYNDOVA H, HOLOCHOVA P, KOSINA M, MASLANOVA I, SEDLACEK I (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *Int J Syst Evol Microbiol*, **62**: 1499-1505.
- TANASUPAWAT S, SUKONTASING S, LEE JS (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J Syst Evol Microbiol*, **58**: 1630-1634.
- TEIXEIRA LM, FACKLAM RR, STEIGERWALT AG, PIGOTT NE, MERQUIOR VLC, BRENNER DJ (1995). Correlation between phenotypic characteristics and DNA relatedness within *Enterococcus faecium* strains. *J Clin Microbiol*, **33**: 1520-1523.
- TEIXEIRA LM, CARVALHO M da GS, ESPINOLA MMB, STEIGERWALT AG, DOUGLAS MP, BRENNER DJ, FACKLAM RR (2001). *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**: 1737-1743.
- TEIXEIRA LM, MERQUIOR VLC (2013). Molecular Typing in Bacterial Infections In: *Enterococcus*. Ed: Filippis, I., McKee M.L., Springer, London. p.:17-26.
- TEUBER M (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*, **4** (5): 493-499.

- TEUBER M, MEILE L, SCHWARZ F (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, **76** (1-4): 115–137.
- THRELFALL E J (1992). Antibiotics and selection of food-borne pathogens. *J Appl Bacteriol*, **73** (21): 96-102.
- TRIVEDI K, CUPAKOVA S, KARRISKOVA R (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in Enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, **56** (7): 352-357.
- TYRRELL GJ, TURNBULL L, TEIXEIRA LM, LEFEBVRE J, CARVALHO MGS, FACKLAM RR, LOVGREN M (2002). *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol*, **40**: 1140-1145.
- VAN DEN BOGAARD AE, STOBBERINGH EE (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents*, **14**(4): 327-335.
- VANCANNEYT M, SNAUWAERT C, CLEENWERCK I, BAELE M, DESCHEEMAEKER P, GOOSSENS H, POT B, VANDAMME P, SWINGS J, HAESBROUCK F, DEVRIESE LA (2001). *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**: 393-400.
- VANCANNEYT M, ZAMFIR M, DEVRIESE LA, LEFEBVRE K, ENGELBEEN K, VANDEMEULEBROECKE K, AMAR M, DE VUYST L, HAESBROUCK F, SWINGS J (2004). *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**: 2175-2179.
- VAN DEN BERGHE E, DE WINTER T, DE VUYST L (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int J Food Microbiol*, **107** (2): 159-170.
- VANKERCKHOVEN V, HUYS G, VANCANNEYTM, SNAUWAERTC, SWINGSJ, KLARE I, WITTE W, AUTGAERDEN TV, CHAPELLE S, LAMMENS C, GOOSSENS H (2008). Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol*, **74**(14): 4247-4255.
- VERRAES C, VAN BOXSTAEL S, VAN MEERVENNE E (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health*, **10**(7): 2643-2669.
- WANG JS, MUZEVICH K, EDMOND MB, BEARMAN G, STEVENS MP (2014). Central nervous system infections due to vancomycin-resistant Enterococci: case series and review of the literature. *Int J Infect Dis*, **25**: 26–31.
- WEAVER KE, KWONG SM, FIRTH N, FRANCI MV (2009). The RepA N replicons of Gram-positive bacteria: A family of broadly distributed but narrow host range plasmids. *Plasmid*, **61** (2): 94–109.
- WEGENER HC, MADSEN M, NIELSEN N, AARESTRUP FM (1997). Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. *Int j Food Microbiol*, **35** (1): 57-66.

- WERNER G, COQUE TM, HAMMERUM AM, HOPE R, HRYNIEWICZ W, JOHNSON A, KLARE I, KRISTINSON KG, LECLERCQ R, LESTER CH, LILLIE M, NOVAIS C, OLSON-LILJEQUIST B, PEIXE LV, SADOVY E, SIMONSEN GS, TOP J, VUOPIO-VARKILA J, WILLEMS RJ, WITTE W, WOODFORD N (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, **13**: 1-11.
- WERNER G, COQUE TM, FRANZ CMAP, GROHMANN E, HEGSTAD K, JENSEN L, SCHAIK W, WEAVER K (2013). Antibiotic resistant Enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol*, **303** (6-7): 360– 379.
- WILLIAMS AM, FARROW JAE, COLLINS MD (1989). Reverse transcriptase sequencing of 16s ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett Appl Microbiol*, **8**: 185-189.
- WILLIAMS JJ, HERGENROTHER PJ (2008). Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, **12** (4): 389–399.
- WITTE W (1999). Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Antimicrob Chemother*, **44** (1): 1-9.
- WRIGHT GD (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chem Commun*, **47** (14): 4055–4061.
- YILMAZ EŞ, ASLANTAŞ Ö, ÖNEN SP, TÜRKYILMAZ S, KÜREKCI C (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in Enterococci from food of animal origin in Turkey. *Lwt-Food Sci Technol*, **66**: 20-26.
- YUEN GJ, AUSUBEL FM (2014). *Enterococcus* infection biology: lessons from invertebrate host models. *J Microbiol*, **52** (3): 200–210.
- ZHANEL GG, HOBAN DJ, KARLOWSKY JA (2001). Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**(1): 324–326.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Bahar

Soyadı: Onaran

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 01.05.1988

Uyruğu: TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi: Ankaralılar Cad. Kafkas Sitesi 411. Sokak No:16 Ümitköy/Ankara

Telefonu: 0534 6303456

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

2006-2011: Üniversite

2002-2005: Lise

1999-2002: Ortaokul

1994-1999: İlkokul

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

2012-Halen: Arş. Gör.

IV- Mesleki Deneyimi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Onaran B., Bilir Ormancı F. S. (2013). Yenilebilir film ve kaplamalar. 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, 3-6 Nisan, Antalya, 2013. (poster)

Şireli U. T., **Onaran B.** (2013). Uzun yaşamın sırrı: Yoğurt. *Süt hattı*. 16:16.

Şireli U. T., **Onaran B.** (2013). Avrupa ve Amerika'da Salmonella Kontrolündeki Başarı ve Gelişmeler. Veteriner Tavukçuluk Derneği Mektup Ankara. 11(3): 3-4.

Şireli U. T., **Onaran B.** (2013). Süt ve Süt Ürünleri Tüketiminin Kanser Hastalıkları ile İlişkisi. TGDF Gıda Kongresi, 12-14 Kasım, Antalya, 2013. (poster)

Şireli, U. T., Filazi, A., **Onaran, B.**, Artık, N., Ülker, H. (2015). Etlerdeki Kalıntı Endişeleri. Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics; 1(2): 7-16.

Onaran B., Bilir Ormancı F. S. (2015). Kefir from different countries. Saraybosna. The 3rd International Symposium On Traditional Foods From Adriatic To Caucasus. 1-4 Ekim 2015. (poster)

İplikçioğlu Çil, G., Şireli, U. T., **Onaran, B.** (2015). Hygienic Control of Three Broiler Houses to Detect the Effectiveness of a Commercial Disinfectant. Cape town. 19. World Veterinary Poultry Association Congress. 2015. 7-11 Eylül, Cape Town, Güney Afrika. (poster)

Küplülü Ö, Orhan CE, **Onaran B.** (2016). Mad honey poisoning in Turkey. 7th International Meeting 'Days of Veterinary Medicine 2016'. Makedonya. (poster)

Onaran B, Ayaz ND, Cufaoglu G, Goncuoglu M, Bilir Ormancı FS, Erol I. (2016). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in cattle and sheep carcasses and presence of *L. monocytogenes* lytic bacteriophages in slaughterhouse wastewater. 3rd International Veterinary Congress. (sözlü sunum)

Onaran B, Cufaoglu G, Ayaz ND, Goncuoglu M, Bilir Ormancı FS. (2016). Biocontrol of *E. coli* O157:H7 in Ready-to-eat Salad Using Lytic Bacteriophage. World Congress on Infection Prevention and Control. Valencia (sözlü sunum)

Onaran B, Cufaoglu G (2017). Comparison of microbial population of household and commercial kefir in Ankara, Turkey. Vet Hekim Der Derg; 88(1): 52-58.

Onaran B, Bülent B (2017). Effects of bacteriocin applications for *Clostridium botulinum* and *Listeria monocytogenes* in seafood products. *Kocatepe Vet J.* DOI: 021376920036292.

Cufaoglu G, **Onaran B,** Ayaz ND, Goncuoglu M, Ormancı FS (2017). Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat salad using a lytic bacteriophage. Med. Weter. 73 (7): 422-424, 2017.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Ödüller

Projeleri:

TÜBİTAK (proje no: 113Z407) Ankara'da satışa sunulan tavuk ve hindi kuşbaşı örneklerinde vankomisin dirençli enterokokların varlığı ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi

TÜBİTAK (proje no:114R104) Sığır, Koyun Karkas ve Piliç Boyun Derisi Örneklerinden İzole Edilen *Listeria monocytogenes* 'lerin Karakterizasyonu ve Mezbaha Atık Sularından Elde Edilen Bakteriyofaj Kokteyli İle Farklı İki Gıda Modelinde *L. monocytogenes*'in Biyokontrolü

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar

Katıldığı eğitim seminerleri

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar: Genovate

Diğer üyelikleri

