

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUK ETİNDE YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİD DİRENÇLİ
ENTEROCOCCUS spp. YAYGINLIĞI VE AMİNOGLİKOZİD-MODİFİYE EDİCİ
ENZİM (AME) GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Meltem YALÇIN

Danışman
Prof. Dr. Yasin TUNCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2018



© 2018 Meltem YALÇIN

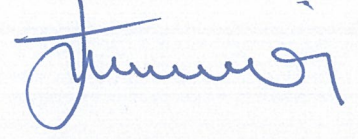
TEZ ONAYI

Meltem YALÇIN tarafından hazırlanan "Tavuk Etinde Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli *Enterococcus* spp. Yaygınlığı ve Aminoglikozid-modifiye Edici Enzim (AME) Genlerinin Belirlenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Yasin TUNCER

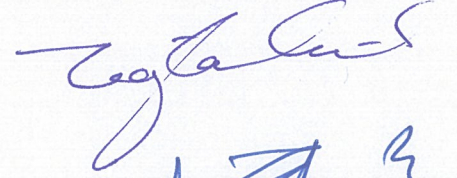
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ

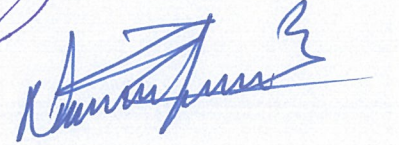
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Havva Nilgün BUDAK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Meltem YALÇIN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Enterokokların Genel Özellikleri	4
2.2. Gıdalarda Enterokoklar	6
2.3. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç	12
2.3.1. β - laktam direnci	13
2.3.2. Glikopeptid direnci	14
2.3.3. Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci	15
2.3.4. Kinolon direnci	15
2.3.5. Kloramfenikol direnci	16
2.3.6. Oksazolidinon direnci	16
2.3.7. Rifampin direnci	16
2.3.8. Tetrasiklin direnci	17
2.3.9. Aminoglikozidlere direnç	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Tavuk örnekleri	21
3.1.2. Mikroorganizmalar	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel <i>Enterococcus</i> suşlarının izolasyonu	21
3.2.2. YSAD izolatların cins düzeyinde tanısı.....	22
3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi	22
3.2.2.2. Kültürel testler	23
3.2.2.3. İzolatların <i>Enterococcus</i> cinsine özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı.....	23
3.2.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu	23
3.2.2.3.2. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi	24
3.2.2.3.3. YSAD izolatların cinse özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı.....	25
3.2.3. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının tür düzeyinde tanısı	26
3.2.3.1. Türe özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı	26
3.2.3.2. Türe özgü primerler ile tanısı yapılamayan <i>Enterococcus</i> izolatlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı	28
3.2.4. YSAD <i>Enterococcus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi	29

3.2.5. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) sıvı mikrodilasyon yöntemiyle belirlenmesi	30
3.2.6. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) geni varlığının PZR ile araştırılması	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	33
4.1. Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) Muhtemel <i>Enterococcus</i> suşlarının İzolasyonu ve Cins Düzeyinde Tanısı	33
4.2. YSAD <i>Enterococcus</i> İzolatlarının Tür Düzeyinde Tanısı	37
4.3. YSAD <i>Enterococcus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	42
4.4. YSAD <i>Enterococcus</i> İzolatlarının Gentamisin ve Streptomisin Antibiyotiklerine Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK)	49
4.5. YSAD <i>Enterococcus</i> İzolatlarında Aminoglikozid-modifiye Edici Enzim (AME) Genlerinin PZR ile araştırılması	52
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	83

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TAVUK ETİNDE YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİD DİRENÇLİ *ENTEROCOCCUS* spp. YAYGINLIĞI VE AMİNOGLİKOZİD-MODİFİYE EDİCİ ENZİM (AME) GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Meltem YALÇIN

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Yasin TUNCER

Bu çalışmada, Antalya ve Isparta illerinden temin edilen 112 tavuk eti örneğinde yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) *Enterococcus* yaygınlığı ve aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) geni varlığı araştırılmıştır. Ayrıca izolatların antibiyotik direnç profilleri ile gentamisin ve streptomisin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) da belirlenmiştir. Bu çalışmada toplam 32 YSAD *Enterococcus* suşu izole edilmiştir. 32 YSAD izolatının 7'si yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) ve 25'i yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD)'dir. İzolatlar türe özgü polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve 16S rDNA dizi analizi ile *E. faecium* (18, % 56.25), *E. faecalis* (5, % 15.63), *E. durans* (5, % 15.63), *E. avium* (3, % 9.37) ve *E. casseliflavus* (1, % 3.12) olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon testi sonucu, YSAD *Enterococcus* izolatlarının en duyarlı olduğu antibiyotiklerin ampisilin (% 93.75), linezolid (% 93.75), penisilin G (% 90.62), teikoplanin (% 90.62), nitrofurantoin (% 78.12), vankomisin (% 75) ve kloramfenikol (% 68.75) olduğu saptanmıştır. İzolatlarının en dirençli olduğu antibiyotiklerin eritromisin (% 96.87), minosiklin (% 96.87), streptomisin (% 96.87) ve tetrasiklin (% 96.87) olduğu belirlenmiştir. İzolatların tamamı çoklu antibiyotik direncine sahip bulunmuştur. YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin MİK değerlerinin sırasıyla 16 ile >4096 ve 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'inin (% 56.25) hem YSSD hem de YSGD oldukları tespit edilmiştir. PZR denemeleri sonucu YSAD *Enterococcus* izolatlarının 1 ile 5 arasında değişen sayıda AME geni içerdiği tespit edilmiştir. YSAD *Enterococcus* izolatlarında en sık rastlanan AME genlerinin *ant(6')-Ia* (% 87.5, 28/32), *aph(3')-IIIa* (% 78.13, 25/32), *ant(4')-Ia* (% 68.75, 22/32), *aph(2'')-Ib* (% 62.5, 20/32), *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (% 21.88, 7/32) ve *aph(2'')-Ic* (% 9.38, 3/32) olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarının hiçbirinde *aph(2'')-Id* genine rastlanılmamıştır. Sonuç olarak bu çalışma, tavuk eti örneklerinde YSAD *Enterococcus* varlığını göstermiştir. YSAD *Enterococcus* izolatları tüketici sağlığı açısından risk teşkil edebilir. Ayrıca, bu suşlar yüksek seviyede aminoglikozid direnci ile ilişkili genlerin yayılmasında rezervuar görevi görebilir.

Anahtar Kelimeler: Tavuk eti, *Enterococcus*, yüksek seviyede aminoglikozid direnci, aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) genleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

2018, 83 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

PREVALENCE OF HIGH LEVEL AMINOGLYCOSIDE RESISTANT (HLAR) *ENTEROCOCCUS* SPP. IN CHICKEN MEAT AND DETECTION OF THEIR AMINOGLYCOSIDE-MODIFYING ENZYME (AME) GENES

Meltem YALÇIN

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Yasin TUNCER

In this study, the prevalence of high level aminoglycoside resistant (HLAR) *Enterococcus* in chicken meat obtained from Antalya and Isparta provinces and presence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (AMEs) were investigated. Antibiotic resistance profiles and minimum inhibition concentration (MIC) values were also determined. A total of 32 HLAR *Enterococcus* strains were isolated in this study. Seven out of 32 HLAR isolates are high level of gentamicin resistant (HLGR) and 25 out of 32 HALR isolates are high level streptomycin resistant (HLSR). Isolates were identified as *E. faecium* (18, 56.25%), *E. faecalis* (5, 15.63%), *E. durans* (5, 15.63%), *E. avium* (3, 9.37%) ve *E. casseliflavus* (1, 3.12%) by species-specific polymerase chain reaction (PCR) and 16S rDNA sequence analysis. As a result of the disc diffusion test, HLAR *Enterococcus* isolates were found to be most susceptible to ampicillin (93.75%), linezolid (93.75%), penicillin G (90.62%), teikoplanine (90.62%), nitrofurantoin (78.12%), vancomycin (75%) and chloramphenicol (68.75%). All isolates were found to have multiple antibiotic resistance. Gentamicin and streptomycin minimum inhibitory concentration (MIC) values of HLAR isolates were detected changing in the ranged from 16 to >4096 and 64 to >4096 µg/mL, respectively. Eighteen out of 32 HLAR isolates were identified as both HLGR and HLSR. PCR results showed that HLAR *Enterococcus* isolates contain AME genes ranging of number from one to five. The most common AME genes in HLAR *Enterococcus* isolates were *ant(6')-Ia* (87.5%, 28/32), *aph(3')-IIIa* (78.13%, 25/32), *ant(4')-Ia* (68.75%, 22/32), *aph(2'')-Ib* (62.5%, 20/32), *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (21.88%, 7/32) ve *aph(2'')-Ic* (9.38%, 3/32). The *aph(2'')-Id* gene was not detected in any of the isolates. In conclusion, this study showed the presence of HLAR *Enterococcus* in chicken meat samples. In addition, these isolates can act as a reservoir in the dissemination of genes associated with high levels of aminoglycoside resistance. HLAR *Enterococcus* isolates may pose a risk to consumer health. In addition, these strains can act as a reservoir for the dissemination of genes associated with a high level of aminoglycoside resistance.

Keywords: Chicken meat, *Enterococcus*, high level aminoglycoside resistance, aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes, polymerase chain reaction (PCR)

2018, 83 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yasin TUNCER'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı devam ettirebilmem için desteklerini esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Banu TUNCER'e çok teşekkür ederim.

Araştırma süresince beni yalnız bırakmayan, birlikte çalıştığımız sevgili arkadaşlarım Dr. Didem AKPINAR KANKAYA, Rahime ÖZDEMİR, Hüseyin ÖZTÜRK ve Gıda Yüksek Müh. Euphrem ADIFON'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımında süreklilik ve sabır konusu başta olmak üzere her konuda destek olan başlıca kıymetli dostum Gıda Yüksek Müh. Tuğçe TOK'a, sevgili annem Türkan YALÇIN, sevgili babam Niyazi YALÇIN, sevgili amcam Hamza YALÇIN'a ve tüm aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

5010-YL1-17 No'lu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Meltem YALÇIN
ISPARTA, 2018

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. YSAD muhtemel <i>Enterococcus</i> izolatlarının genomik DNA örnekleri	35
Şekil 4.2. YSAD izolatların <i>Enterococcus</i> cinsine özgü primerler ile çoğaltılan PZR fragmentleri	36
Şekil 4.3. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının <i>E. faecium</i> 'a özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı	38
Şekil 4.4. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının <i>E. faecalis</i> 'e özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı	39
Şekil 4.5. <i>ant(6')-Ia</i> genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü	55
Şekil 4.6. <i>ant(6')-Ia</i> genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı	26
Çizelge 3.2. <i>Enterococcus</i> izolatlarının tür düzeyinde tanısında kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri	27
Çizelge 3.3. <i>Enterococcus</i> suşlarında AME genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.....	32
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında izolasyon yapılan tavuk eti örnekleri, örnek no, temin edildiği iller ve izolat kodları	34
Çizelge 4.2. Tavuk etlerinden izole edilen <i>Enterococcus</i> spp. suşlarının tür düzeyinde tanısı	40
Çizelge 4.3. Tavuk eti örneklerinden izole edilen YSGD*/YSSD** <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımı	42
Çizelge 4.4. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının antibiyotik disk difüzyon test sonuçları	43
Çizelge 4.5. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri	46
Çizelge 4.6. YSAD <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. avium</i> ve <i>E. casseliflavus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri	47
Çizelge 4.7. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı MİK değerleri	50
Çizelge 4.8. YSAD <i>Enterococcus</i> suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili	53
Çizelge 4.9. YSGD <i>Enterococcus</i> izolatlarının AME genotip yüzdeleri	57
Çizelge 4.10. YSSD <i>Enterococcus</i> izolatlarının AME genotip yüzdeleri	58
Çizelge 4.11. YSAD <i>Enterococcus</i> türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları	59
Çizelge 4.12. YSGD <i>Enterococcus</i> türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları	59
Çizelge 4.13. YSSD <i>Enterococcus</i> türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AME	Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim
AAC	Asetiltransferazlar
ANT	Nükleotidiltransferazlar
ATP	Adenozin trifosfat
APH	Fosfotransferazlar
bç	Baz Çifti
BHI	Brain Heart Infusion
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institue
Cyl	Sitolizin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FTS	Fizyolojik tuzlu su
g	Gram
kob	Koloni oluşturan birim
L	Litre
LAB	Laktik Asit Bakterileri
mg	Miligram
mL	Mililitre
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları
MRS	de Man Rogosa Sharpe
NaCl	Sodyum klorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
UV	Ultra Viyole
YSAD	Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli
YSGD	Yüksek Seviyede Gentamisin Dirençli
YSSD	Yüksek Seviyede Streptomisin Dirençli
VRE	Vankomisin dirençli enterokok
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Enterokoklar, Gram pozitif ve katalaz negatif koklar olup, ekosistem içinde toprakta, suda, bitkilerde, gıdalarda, hayvanların ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında bulunabilen, aynı zamanda çiğ gıda maddeleri ile çeşitli fermente gıdalardan da sıklıkla izole edilebilen, homofermentatif laktik asit bakterileridir. Enterokoklar farklı sıcaklık ve pH derecelerine dayanıklı olmalarının yanında ekstrem tuz konsantrasyonunda da gelişebilme yeteneklerinden dolayı fermente gıdalardan yüksek sıklıkla izole edilebilirler. Enterokoklar fırsatçı patojenler olup beslenme ve bakım şartlarının uygun olmadığı koşullarda hayvanlarda sepsisemi, üriner sistem infeksiyonu, endokardit, ishal ve otitis eksternaya neden olabilirler. Enterokokların patojenitesine katkıda bulunan önemli faktörlerin başında bu bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç gelmektedir (Facklam, 1999; Hirsh ve Biberstein, 2004; Koch, 2004; Cariolato vd., 2008; Özden Tuncer vd., 2013; Yogurtcu ve Tuncer, 2013, Tuncer vd., 2014; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Hanchi vd., 2018).

Enterokoklar klinik olarak önemli temel antibiyotiklere karşı doğal (intrensek) ve kazanılmış direnç sahibi olabilirler. Enterokoklar başta beta laktamlar ve aminoglikozidler olmak üzere birçok antibiyotiğe doğal dirençlidir. Bazı antibiyotiklere de çok çabuk direnç geliştirirler (Garrido vd., 2014). Doğal direnç özellikleri türe özgüdür, enterokok türlerinin tümünde bulunan kromozomal direnç ifade eder. Kazanılmış direnç ise, genellikle bir DNA mutasyonu ya da yeni bir DNA segmentinin transferi sonucunda gelişir. Enterokoklarda yeni DNA segmenti transferinden en sık sorumlu olan mekanizma konjugasyondur (Sardan, 2004).

Antibiyotik dirençliliğin bakteriler arasında yayılması global düzeyde endişeye yol açmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde bilinçsiz ve kontrolsüz antibiyotik kullanımı kommensal bakterilerde klinik olarak önemli ilaçlara karşı direnç gelişiminin ve bu direncin yayılmasının temel sebebi olduğunu düşündürmektedir (Mathur ve Singh, 2005). Yararlı mikroflorayı oluşturan

laktik asit bakterilerinin klinik olarak önemli aminoglikozid grubu ilaçlara karşı direnç kazanması ciddi endişe uyandırmaktadır (Jackson vd., 2010). Gentamisin ve streptomisin klinik uygulamalarda kullanılan iki önemli aminoglikozid grubu üyesi antibiyotiktir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile Dünya genelinde yüksek seviyede gentamisin (HLGR) ($\text{MİK} \geq 500 \mu\text{g/mL}$) ve streptomisin dirençli (HLSR) ($\text{MİK} \geq 2000 \mu\text{g/mL}$) bakterilerin izole edildiği rapor edilmiştir (Niu vd., 2016).

Aminoglikozidler yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde, tedavi yöntemlerinin önemli bir bileşeni olmuştur. Bu nedenle bakterilerde yüksek seviyede aminoglikozid direncinin yaygınlaşması enfeksiyonların tedavisinde sorunlara yol açma riskini beraberinde getirmektedir. Ne yazık ki antibiyotiklerin etkinliği, direncinin artması ve yaygınlaşması ile azalmaktadır. Bazı durumlarda direnç seviyeleri neredeyse antibiyotikleri yararsız hale getiren noktaya ulaşır. Çok sayıda ülke insan tedavisinde kullanımı tercih edilen bazı antibiyotiklerin hayvan yetiştiriciliğinde uygulanmasını yasaklamıştır. Aminoglikozidler öncelikle Gram negatif aerobik basiller, stafilokoklar ve diğer Gram pozitiflerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır (Yao ve Moellering, 2007). Bununla birlikte, aminoglikozidlerin Gram-pozitiflere karşı kullanıldığında da, sinerjik etki gösterdikleri, β -laktamlar veya vankomisin gibi diğer antibiyotikler ile kombinasyon halinde kullanılması önerilmektedir (Eliopoulos, 1989; Scaglione vd. 1995; Yao ve Moellering, 2007). Bundan dolayı tedavi edici ve korucuyu olarak çiftlik hayvanlarında kullanımı tavsiye edilmektedir (Jaimee ve Halami, 2016). Aminoglikozidlere karşı bakteriyel direnç mutasyonlar, bozulmuş taşıma ve aktarılabilir direnç ile meydana gelmektedir (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Genel olarak enterokoklar, düşük hücresel geçirgenliklerinden dolayı aminoglikozidlere karşı orta seviyede doğal direnç gösterirler. Gram pozitif bakterilerde en sık karşılaşılan aminoglikozid direnç biçimi aminoglikozid-modifiye edici enzimleri (AMEs) kodlayan genlerin kazanımıdır (Bismuth ve Courvalin, 2010; Niu vd., 2016).

Geçmiş yıllar boyunca enterokoklar özellikle antibiyotik direncinin gelişimi ve yayılımı ile ilgili birçok çalışmaya konu olmuşlardır. Besi hayvanlarında büyümeyi artırıcı ilaçların sık kullanılması sonucu hayvan kaynaklı

enterokoklarda antibiyotik direncinin artmasına ve bu direncin insanlardaki enterokoklarda da yayılmasına neden olmuştur. Günümüze kadar yüksek seviyede aminoglikozid direncinin fosfotransferazlar (APHs), asetiltransferazlar (AACs) ve nükleotidiltransferazlar (ANTs) olmak üzere 3 farklı aminoglikozid-modifiye edici enzim grubunun aktivitesi sonucu gerçekleştiği belirlenmiştir (Garrido vd., 2014; Niu vd., 2016). Streptomisin dışındaki bütün aminoglikozidlere karşı direnç *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni tarafından kodlanan iki fonksiyonlu bir aminoglikozid-modifiye edici enzim olan AAC(6')-APH(2'') aracılığı ile gerçekleşmektedir. *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni yüksek seviyede gentamisin ve kanamisin direnci ile ilişkilidir. Tek fonksiyonlu aminoglikozid-modifiye edici enzimleri kodlayan *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri yüksek seviyede gentamisin, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genleri ise gentamisin dışındaki çeşitli aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur (Vakulenko vd., 2003; Jaimee ve Halami, 2016; Niu vd., 2016).

Yapılan bu tez çalışmasında Isparta ve Antalya illerinden temin edilen tavuk eti örneklerinde yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokok suşlarının varlığının tespiti, izolatların tür düzeyinde tanısı, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi, gentamisin ve streptomisin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin saptanması ve aminoglikozid modifiye edici enzim genlerinin varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Enterokokların Genel Özellikleri

Günümüzde “enterokoklar” olarak adlandırılan bakteriler önceleri “fekal orijinli streptokoklar” olarak sınıflanlandırılmıştır. 1984 yılına kadar *Streptococcus* cinsi içinde sınıflandırılan enterokoklar ilk kez 1989 yılında Thiercelin tarafından yeni bir cins olarak tanımlanmıştır. DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon deneyleri sonucunda, *S. faecalis* ve *S. faecium*’un streptokoklardan ayrılarak *Enterococcus* cinsine aktarılması önerilmiştir. Bu cins içindeki bakteriler daha sonra *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* ve *E. pseudoavium* gibi çeşitli türlere ayrılmıştır. Ayrıca son yıllarda *E. haemoperoxidus*, *E. villorum*, *E. phoeniculicola*, *E. canis*, *E. moraviensis*, *E. columbae* ve *E. cecorum* gibi yeni türler de enterokok cinsi içinde tanımlanmıştır (Koneman vd., 2005).

Enterokoklar, insan ve hayvan bağırsak sisteminde doğal olarak bulunan ve aynı zamanda farklı hayvansal kaynaklı gıdalardan da sıklıkla izole edilen laktik asit bakterileridir (LAB). Enterokoklar farklı sıcaklık ve pH derecelerine dayanıklı olmalarının yanında ekstrem tuz konsantrasyonunda da gelişebilme yeteneklerine sahiptirler. Ayrıca bazı türleri bakteriyosin üreterek fermente gıdaların raf ömrünü ve stabilitesini arttırabilirler. Bu özelliklerinden dolayı pek çok araştırmacı enterokokların starter veya yardımcı kültür olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (De Vuyst, 2000; Eaton ve Gasson, 2002; Ross vd., 2002; Vancanneyt vd., 2002; Linaje vd., 2004). Enterokokların fermente gıdalarda starter kültür olarak aktif rol almasının yanı sıra bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda bakteriyemi, endokarditis, idrar yolu enfeksiyonları gibi nozokomiyal hastalıklara sebep oldukları bilinmektedir. Enterokoklar primer patojenler olarak değerlendirilmezler ancak antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç gösterme yeteneklerine bağlı olarak Dünya çapında nozokomiyal patojenler olarak ortaya çıkmaktadırlar (Linden ve Miller, 1999).

Enterokoklar Gram-pozitif, spor oluşturmeyan, katalaz ve oksidaz negatif, fakültatif anaerob ve kok morfolojisine sahiptirler (Songer ve Post, 2015). Enterokoklar sıvı besiyeri ortamlarında 0.6-2.0 x 0.6-2.5 mm çiftli ya da zincir şeklinde olup, endospor oluşturmazlar. Optimum gelişme sıcaklıkları 35 °C olmakla beraber bu cins içerisinde yer alan birçok tür 10 °C ile 45 °C arasında gelişme gösterebilir. Yeni tanımlanmış türler; *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus* ve *E. moraviensis* 45 °C'de, *E. cecorum* ve *E. columbae* 10 °C'de gelişme gösterememektedir. Enterokoklar % 6.5 NaCl varlığında ve ortam pH'sının 9.6 olması durumunda gelişebilmelerinin yanı sıra 60 °C'de 30 ve 60 dakika ısı uygulamasına karşı da dirençlidirler. İstisna olarak *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* ve *E. columbae* türleri % 6.5 NaCl varlığında yavaş gelişme gösterirler veya hiç gelişmezler. Eskulini hidrolize edebilen enterokoklar aynı zamanda 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü (TCC) indirgeyebilirler (Franz vd., 1999; Klein, 2003; Foulquié Moreno vd., 2006; Fisher ve Phillips, 2009).

Enterokokların besin gereksinimleri komplekstir (Holt vd., 1994). Gelişebilmeleri için gerek B grubu vitaminlere ve gerekse bazı temel amino asitlere pek çok Gram pozitif bakteriden daha fazla gereksinim duyarlar (Hayaloglu ve Erginkaya, 2001). Belirli türlerin üreme faktörü olarak bazı spesifik aminoasitlere gereksinim duymalarından dolayı bu spesifik aminoasitlerin nicel olarak belirlenmesinde test organizması olarak kullanılmaktadırlar. Enterokok türleri çoğunlukla α ve γ hemolitik aktiviteye sahiptir. Lancefield serolojik D grubunda yer alan enterokoklar laktozu fermente edebilirler, arabinoz pozitif ve pürivat negatiftirler (Willey vd., 1999). Karbonhidratları fermente ederek L (+) laktik asit oluştururlar ancak gaz oluşturmazlar ve bu özelliklerinden dolayı tipik homofermentatif LAB olarak bilinirler (Klein vd., 1998; De Vuyst, 2000; Morgen ve Hill, 2002; Doming vd., 2003; Linaje vd., 2004).

2.2. Gıdalarda Enterokoklar

Enterococcus cinsi üyesi bakterilerin pastörizasyon sıcaklıklarına direnç göstermeleri ve farklı maddeler ve gelişim koşullarına (düşük ve yüksek ısı, yüksek pH ve tuz) adaptasyon yetenekleri, bunların çiğ materyalden (et veya süt) üretilen gıdalarda ve ısıtıl işlem görmüş gıdalarda bulunmasına imkan tanımaktadır. Bundan dolayı, enterokoklar fermente gıdaların özellikle de fermente peynir ve etlerin mikrobiyotasının önemli bir kısmı oluştururlar (Çetinkaya ve Muş, 2010). Enterokoklar çevrede çok geniş bir alana yayılmış olup, ekosistem içinde memeliler, kuşlar, kanatlılardan, insan ve hayvan sindirim sisteminden, topraktan, yüzey sularından, bitkilerden ve çeşitli fermente gıdalardan sıklıkla izole edilmektedirler (Devriese ve Pot, 1995; Sümerkan, 2002; Strompfová vd., 2008; Kim vd., 2018).

Organik çıkartılar ile doğaya yayılan ve fiziki şartlara karşı gösterdikleri direnç sebebiyle *in-vitro* şartlarda uzun süre canlılığını devam ettirebilen enterokoklardan özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis* türleri, gıdalardan en sık izole edilen ve gıda proseslerinde yer alan en önemli enterokok türleridir (De Vuyst vd., 2003; Klein, 2003; Toğay vd., 2014; Hammad vd., 2015; Hashem vd., 2015). Gıdalarda lipolitik, esterolitik aktivite göstermelerinin yanı sıra, sitrattan yararlanma ve uçucu aromatik bileşikler oluşturma gibi özellikleri sebebi ile gıda mikrobiyolojisi açısından da önemli endüstriyel mikroorganizmalardır. Ayrıca, bazı gıdaların tat, renk, koku gibi organoleptik özelliklerini iyileştirmekte ve geliştirmektedirler. Bu sebeple, diğer LAB ile birlikte fermente süt ve et ürünlerinde doğal starter kültür olarak kullanılmaktadırlar (Müller vd., 2001; Giraffa, 2002; Hugas vd., 2003; Maschieto vd., 2004).

Enterokoklar probiyotik olarak gıda ürünlerinde geniş kullanım alanına sahiptirler. Bunların yanı sıra enterokoklar laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında başlatıcı kültür olarak da kullanılır. Peynirlerden, et ve et ürünlerinden ve diğer yiyeceklerden izole edilebilirler (Facklam ve Teixeira, 1998; Charles vd., 2001; Billströma, 2008). Bundan dolayı araştırmaların büyük

bir kısmı, enterokok suşlarının geleneksel peynirler ve et ürünlerindeki kullanılabilirliği üzerine yoğunlaşmıştır (De Vuyst vd., 2003; Foulquié Moreno vd., 2006; Gomes vd., 2010; Pirouzian vd., 2010). Enterokoklar genellikle güvenli kabul edilen (GRAS - Generally Recognized As Safe) mikroorganizmalar statüsünde değildirler. Gıda yoluyla alınan antibiyotik dirençli suşların, insan bağırsak florasında bulunan diğer bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına yol açabileceği düşünülmektedir (Doğru vd., 2010).

Et ve süt ürünlerinde enterokokların varlığı ve tanımlanmasına ilişkin sonuçların yer aldığı çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalar peynir, sosis, siyah zeytin, değişik tip turşular, bazı Afrika ve Doğu Asya kökenli geleneksel fermente gıdalarda enterokok suşlarının fermentasyonun başlatılmasının yanı sıra, ürünün tipik yapısal ve organoleptik özelliklerinin geliştirilmesinden de sorumlu olduğunu göstermiştir (Centeno vd., 1996; Hamad vd., 1997; Yousif vd., 2005; Yoon vd., 2008). Enterokoklar fermente gıda ürünlerinin organoleptik özellikleri üzerine olumlu katkılarının yanında laktik asit ve bakteriyosin üretme yetenekleri ile de gıda teknolojisi açısından önem arz etmektedirler. Son yıllarda enterokokların starter veya ek kültür olarak kullanımı ile ilgili yapılan çalışma sayısı giderek artmaktadır (Toğay ve Temiz, 2011).

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan birçok çalışmada gıda örneklerinden yüksek oranda enterokok cinsi üyesi türlerin izole edildiği göstermiştir (Devriese vd., 1995; Giraffa vd., 2002; Chingwaru vd., 2002; Bodil ve Klein, 2003; Cosentino vd., 2004; Moreno vd., 2006; Tansuphasin vd., 2006; Gomes vd., 2008; Koluman vd., 2009; Çıtak vd., 2009; Riboldi vd., 2009; Tuncer, 2009; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Kim vd., 2018). Devriese vd. (1995), taze ve hazır gıda örneklerinde yaptıkları çalışmada izole ettikleri 161 enterokok izolatının 94'ünü (% 58.3) *E. faecalis*, 71'ini (% 44.1) *E. faecium* ve 15'ini (% 9.3) de *E. hirae* veya *E. durans* olarak tespit etmişlerdir. Giraffa vd. (2002), *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin yapılan birçok araştırmada gıdalardan en fazla izole edilen mikroorganizmalar olduğunu belirtmişlerdir. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. mundtii* ve *E. raffinosus* türlerinin ise daha az sıklıkta

izole edildiğini bildirmişlerdir. Chingwaru vd. (2002), Botsvana'nın başkenti Gaborone'de yaptıkları bir çalışmada 342 gıda örneğinden (227 süt, 57 sığır eti ve 58 tavuk) 1467 enterokok izole etmişlerdir. İzolatların % 46.1'i *E. faecalis*, % 29'u *E. faecium* olarak tespit edilmiştir. *E. casseliflavus* (% 7.6), *E. gallinarum* (% 7.4), *E. avium* (% 5.5), *E. durans* (% 2.1), *E. hirae* (% 2.0) ve *E. mundtii* (% 0.3) de izole edilen diğer enterokok türleri arasındadır. Benzer olarak Bodil ve Klein (2003), yapmış olduğu bir çalışmada, enterokokların birçok gıdada, özellikle de hayvansal orijinli gıdalarda bulunduğunu ve *E. faecium*'un fermente gıdalardan sıklıkla izole edildiğini bildirmişlerdir. İspanya'da gerçekleştirilen bir çalışmada, keçi sütü örneklerinin % 63.6'sından enterokok izole edildiği ve bu izolatların *E. faecalis* ve *E. faecium*'a ait olduğu bildirilmiştir (Cocconcelli vd., 2003). Cosentino vd. (2004), deneysel olarak üretilen Fiero Sardo peynirinden izole ettikleri 118 enterokok suşunun 84'ünü *E. faecium*, 24'ünü *E. durans* ve 10'unu *E. faecalis* olarak tanımlandığını rapor etmişlerdir. Moreno vd. (2006), peynir, balık, sosis, dana kıyma ve domuz etinden çoğunlukla *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerini izole etmişlerdir. Dondurulmuş 103 hayvansal (tavuk, karides) gıda örneğinin kullanıldığı çalışmada, 113 enterokok izolatının içinden en yüksek sıklıkta *E. faecalis* (% 28.9) ve *E. faecium* (% 8.8) türlerinin izole edildiğini bunun yanı sıra *E. durans* (% 4.2), *E. raffinosus* (% 0.8) ve diğer türlerin de (% 4.6 oranında *E. avium*, *E. mallodoratus*, *E. hirae* ve *E. gallinarum*) bulunduğunu bildirmişlerdir (Tansuphasin vd., 2006). Gomes vd. (2008), yapmış oldukları çalışmada et, süt ve sebzeden en fazla izole edilen *Enterococcus* türünün *E. faecium* olduğunu, bunu takiben *E. faecalis*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* türlerinin geldiğini rapor etmişlerdir. Ülkemizde ise Koluman vd. (2009), et, peynir, yoğurt, hazır tüketilen gıdalar (burger, pizza, sütlü tatlılar, salatalar vb.) ve baharatlardan oluşan toplam 200 gıda örneğinin 100'ünün (% 50) *Enterococcus* spp. (başlıca *E. faecalis* ve *E. faecium*) ile kontamine olduğunu tespit etmişlerdir. Fisher vd. (2009), yapmış oldukları bir çalışmada, sosislerde ve peynirlerde *Enterococcus* kontaminasyonunun daha sıklıkla olduğunu, bu gıdaların ısıtma işlem gördüğü için raf ömürlerinin daha uzun süreli olduğunu bildirmişlerdir. Çıtak vd. (2009), Ankara'da çeşitli süpermarketlerde satışı sunulan 120 dondurulmuş et ve sebze örneğinden toplam 63 (% 52.5) enterokok türü izole etmişlerdir. Araştırmacılar izolatların 40'ını (% 63.4) fekal

enterokok olarak tanımlamış ve bunlardan en yüksek sıklıkta *E. faecalis* (28, % 70) ve *E. faecium* (12, % 30) türü üyelerini tanımlamıştır. Diğer enterokok türlerinin ise *E. hirae* (7, % 11.1), *E. durans* (6, % 9.5), *E. gallinarum* (4, % 6.4), *E. mundtii* (4, % 6.4) ve *E. raffinosus* (2, % 3.2) olduğunu tespit etmişlerdir. Brezilya’da yapılan bir çalışmada incelenen çiğ sebze, çiğ et, pastörize süt ve süt ürünlerinden (peynir) izole edilen 56 *Enterococcus* suşunun 27’si *E. faecalis*, 23’ü *E. faecium* ve 6’sı *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmıştır (Riboldi vd., 2009). Tuncer (2009), tarafından yapılan çalışmada tulum peynirinden 17 *E. faecium*, 11 *E. faecalis*, 11 *E. durans* olmak üzere toplam 39 *Enterococcus* cinsine ait izolat elde edildiği bildirilmiştir. Yogurtcu ve Tuncer (2013), 32 tulum peynirinden izole ettikleri 47 enterokok izolatının 21’inin *E. faecium*, 14’ünün *E. durans* ve 12’sinin *E. faecalis* olduğunu belirtmişlerdir. Avcı ve Özden (2017), 33 farklı peynir örneğinden 11 bakteriyosin üreticisi *Enterococcus* izole etmiş, 6’sını *E. faecium* ve 5’ini *E. faecalis* olarak tanımlamışlardır. Kim vd. (2018), Güney Kore’de yaptıkları çalışmada 144 tavuk karkasından (72 geleneksel ve 72 organik tavuk) izole edilen 104 *Enterococcus* suşundan 70’i *E. faecalis*, 15’i *E. hirae*, 8’i *E. faecium*, 6’sı *E. durans*, 4’ü *E. casseliflavus* ve 1’i *E. avium* olarak tanımlanmıştır.

Et ve et ürünleri insan beslenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Et ve et ürünleri patojen mikroorganizmaların rahatlıkla üreyebileceği ve gelişimlerini sürdürebilecekleri oldukça uygun bir ortamdır. Fermente edilmiş et ürünleri ise, düşük pH ve su aktivitesi, düşük nem içeriği ve yüksek tuz konsantrasyonu ile uzun raf ömrüne sahip dayanıklı ürünlerdir (Denktaş, 2017). Enterokokların fermente gıdaların üretiminde doğal starter mikroorganizmalar olarak endüstriyel amaçlı kullanımlarının yanı sıra, kesimhanelerdeki bozuk hijyen sebebi ile de ürünlerde kolonize olabildikleri ve fermentasyon amacı ile bekletilme esnasında da çoğalarak baskın hale gelebildikleri tespit edilmiştir (Wegener vd., 1997; Giraffa, 2002; Papamanoli vd., 2003). Yapılan bir çalışmada, *Enterococcus* spp. sayısının çiğ etlerde 10^2 - 10^4 kob/g aralığında olduğu belirlenmiştir. Bu bakterilerin sıcaklık, pH ve tuzlamaya karşı oldukça dirençli olduklarından, işlenmiş ürünlerde hızla çoğalarak bozulmaya neden oldukları ve gıdaların fermentasyonu sırasında çoğaldıkları rapor edilmiştir (Giraffa, 2002).

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan birçok çalışmada çiğ et ve fermente et ürünlerinde yüksek oranda enterokok cinsi üyesi türlerin olduğu ve enterokokların bu ürünlere has karakteristik özelliklerin kazandırılmasında olumlu rol oynadıkları bildirilmiştir (Franz vd., 1999; Giraffa, 2002; Papamanoli vd., 2003; Hugas vd., 2003; Fontana vd., 2009; Barbosa vd., 2009; Kinley vd., 2010; Karabıyık, 2011; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015). Enterokoklar fermente etlerin özellikle sucukların fermentasyonu sırasındaki baskın mikrobiyotayı oluştururlar. Fermente ürünlerin olgunlaştırılması sırasında istenen metabolik ve teknolojik özellikleri kazanabilmeleri için *Enterococcus* cinsi bakteriler, özellikle de *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları fermente sucukların üretiminde bazı LAB ile birlikte kullanılan starter kültürler arasında yer almaktadır (Eaton ve Gasson, 2001; Leroy vd., 2003; Linaje vd., 2004; Psoni vd., 2006; Enginkaya vd., 2007).

Sucuklarda yapılan bazı araştırmalarda, fermente et ürünlerindeki enterokok varlığının, özellikle, *E. faecium*'un, sucuk aromasına glikolitik, proteolitik ve lipolitik aktiviteleri ile katkıda bulunduğu, taze etlerde kırmızı renk oluşumunda rol oynadığı, sucuk üretiminde starter kültür olarak özellikle de *E. faecium* CTC492'nin kullanılması halinde, bu suşun işlem sonuna kadar etkinliğini sürdürdüğü tespit edilmiştir (Hugas vd., 2003a). Yine Hugas vd. (2003b) tarafından yapılan bir başka çalışmada, Alman ve İtalyan fermente sosislerinde olgunlaştırma prosesinin sonunda hem starter kültür kullanılan, hem de starter kültür kullanılmayan sosislerde enterokok sayısının 10^3 - 10^5 kob/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar sosislerin olgunlaştırılması sırasında enterokokların varlığını bu bakterilerin tuza olan yüksek toleranslarından ve geniş sıcaklık aralıklarında gelişebilme yeteneklerinden ileri geldiğini bildirmişlerdir. Papamanoli vd. (2003), fermente sosis örneklerinden izole LAB'nin % 4'ünün *Enterococcus* cinsi üyesi olduğunu bildirmişlerdir. Sustackova vd. (2004), tarafından yapılan bir çalışmada et ürünlerinden izole edilen bakteriler arasında enterokokların yüksek oranda bulunduğu ve tespit edilen enterokok izolatlarının % 67'sinin *E. faecalis*, % 13.7'sinin *E. faecium* türüne ait olduğu belirtilmiştir. Martin vd. (2005), fermente sosisler üzerine yaptıkları bir çalışmada sosislerden izole edilen *Enterococcus* türleri arasında *E. faecium*'un en

sık izole edilen tür olduğunu tespit etmişlerdir. Adana’da yapılan bir çalışmada çeşitli market ve kasaplardan temin edilen 20 adet sucuk örneğinden *E. faecium*, *E. durans* ve *E. avium* türleri izole edildiği bildirilmiştir (Karataş, 2005). Pedonese vd. (2005), İtalya’nın Toskana bölgesinde inceledikleri 57 çiğ ve işlenmiş et örneğinin 3’ünün (2’si tavuk etinden hamburger ve 1’i İtalyan salamı) vankomisine dirençli enterokokları içerdiğini ve tüm izolatların *E. faecium* olarak tanımladığını rapor etmişlerdir. Foulquié Moreno vd. (2006), peynir, balık, sosis, dana kıyma ve domuz etinden çoğunlukla *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerini izole etmişlerdir. Messi vd. (2006), et ve çevresel örneklerde vankomisin dirençli enterokokların dağılımını araştırdıkları çalışmalarında, 59 et izolatının glikopeptid dirençli enterokok içerdiğini belirlemişlerdir. Yine Savaşan vd. (2008), tarafından balık etlerinden izole edilen bakterilerin 26’sının *E. faecalis* suşu olduğu rapor edilmiştir. Arjantin’de yapılan bir çalışmada, fermente sosis örneklerinden izole edilen enterokok türlerinin yüksek oranda *E. faecium* (% 56) ve *E. faecalis* (% 17) türüne ait suşlar olduğu bildirilmiştir. Bu iki türün dışında *E. durans*, *E. casseliflavus* ve *E. mundtii* türüne ait suşların ise daha düşük sayıda izole edildiği rapor edilmiştir (Fontana vd., 2009). Barbosa vd. (2009), yapmış olduğu çalışmada, fermente etlerden izole edilen 182 *Enterococcus* izolatından 76’sının *E. faecalis*, 44’ünün *E. faecium*, 1’inin *E. casseliflavus* ve 31’inin *Enterococcus* spp. olduğunu bildirmişlerdir. Valenzuela vd. (2009), yapmış olduğu çalışmada, hayvansal gıdalardan izole edilen 25 *Enterococcus* izolatının 16’sını *E. faecium*, 9’unu *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. İşlenmiş hayvansal ürünlerle yapılan bir başka çalışmada ise *Salmonella* ve *Enterococcus* varlığı araştırılarak kullanılan ürünlerin % 81.3’ünden *Enterococcus* cinsi üyesi türler izole edilmiştir (Kinley vd., 2010). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, fermente et ürünlerinden izole edilen 134 *Enterococcus* izolatının 79’u *E. faecium*, 35’i *E. faecalis*, 13’ü *E. gallinarum*, 5’i *E. durans*, 1’i *E. avium* ve 1’i *E. hirae* olarak tespit edilmiştir (Karabıyık, 2011). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada ise, fermente doğal sucuk örneklerinden izole edilen 65 LAB’dan 25’inin *Enterococcus* cinsi üyesi olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen enterokok suşlarının 24’ünün *E. faecium* ve 1’inin ise *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir (Yüceer ve Özden Tuncer, 2015). Demirgöl ve Tuncer (2017) yapmış olduğu çalışmada, sucuktan 60 *Enterococcus* suşu izole etmiş,

bunları *E. faecium* (44 suş), *E. faecalis* (7 suş), *E. hirae* (5 suş), *E. durans* (2 suş), *E. mundtii* (1 suş) ve *E. thailandicus* (1 suş) olarak tanımlamıştır. Akpınar Kankaya (2017), Türkiye genelinde farklı illerden temin edilen çeşitli hayvansal gıdalardan (340 adet) vankomisin dirençli enterokokların (VRE) izolasyonu sonucunda, 47 muhtemel VRE izolatından 3'ünü *E. casseliflavus*, 21'ini *E. gallinarum* ve 2'sini *E. casseliflavus/E. gallinarum* olarak tanımlamıştır.

2.3. Enterokoklarda Antibiyotik Direnç

Enterokokların insan sağlığı açısından dikkat çekmesinin önemli nedenlerinden biri antibiyotiklere karşı gösterdikleri dirençtir. Ekstrem çevresel koşullara adaptasyon yeteneği yüksek bakteriler olan enterokokların birçok antibiyotiğe karşı doğal direnç göstermelerinin yanı sıra klinik olarak önemli farklı grup antibiyotiklere karşı da kolaylıkla direnç kazanabilmeleri bu bakterilerin patojenitesini artırmaktadır (Yoğurtçu, 2011; Abauelnaga vd., 2016). Son yıllarda antibiyotiğe dirençli enterokok suşlarına gıdalarda yaygın olarak rastlanılmaktadır. Antibiyotik dirençli enterokok suşları et ürünlerinde, süt ürünlerinde, hazır gıdalarda ve hatta probiyotik olarak kullanılan suşlarda dahi görülmektedir. Enterokoklarda antibiyotik direncinin gelişmesinde rol oynayan en önemli faktörlerden birisi, antibiyotiklerin hayvansal gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmasının yaygınlaşmasıdır (Sallem vd., 2016). Hayvansal gıda, dışkı kontaminasyonu ile çevrede su ve toprakta enterokokların yayılmasına ve buradan da insana dirençli bakterilerin bulaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca, besi hayvanlarında büyümeyi artırıcı ilaçların sık kullanımı da hayvansal gıdalardan izole edilen enterokoklarda antibiyotik direncinin artmasına neden olmuştur. Antibiyotiklerin kontrolsüz bir şekilde hayvan beslenmesinde gelişim artırıcı olarak kullanılması, dirençli *E. faecium* türlerinin ortaya çıkmasında selektif ajan rolü taşımaktadır (Cocconcelli vd., 2003; Malek vd., 2012; Sallem vd., 2016).

Enterokoklar birçok antibiyotiğe karşı türe özgü olarak doğal direnç göstermelerinin yanı sıra, mutasyona uğrayarak ve plazmidler, transpozonlar ve kromozomlar üzerindeki direnç genlerine bağlı olarak kazanılmış dirence de

sahip olabilmektedirler. Bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir (Basustaoglu, 2004; Sardan, 2004). Sefalosporinler, aminoglikozidler, polimiksinler, linkomisin ve klindamisine karşı oluşan direnç doğal direnç olarak tanımlanmaktadır. Makrolidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, trimetoprim sulfametoksazol, rifampin, aminoglikozidler, glikopeptidler (vankomisin ve teikoplanin vb.) ve ampisiline karşı oluşan direnç ise kazanılmış direnç denilmektedir. Ampisilin, vankomisin ve gentamisin, çoklu antibiyotiğe dirençli enterokokların tedavisinde klinik olarak en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir (Franz vd., 1999; İşleroğlu vd., 2008).

Bir antibiyotiğe karşı dirençli olan mikroorganizmanın, benzer sistem ile etki eden diğer antibiyotiklere karşı da dirençli olması çapraz direnç olarak adlandırılır. Genellikle eritromisin, neomisin, kanamisin gibi benzer özellikteki antibiyotikler arasında görülmektedir (Yalanca, 2009). Enterokoklarda geçtiğimiz son yıllar içerisinde ortaya çıkan kazanılmış antibiyotik direncinde, özellikle yüksek düzey aminoglikozid direnci, β -laktamlar ve glikopeptidlere direnç artan oranlarda bildirilmektedir. Hücre duvarına etkili ajanlara dirençli olan ya da yüksek seviyede aminoglikozid direncine sahip izolatlar kombinasyon tedavisinin sinerjistik etkisine direnç gösterecekleri için daha da ciddi problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla bu grup antimikrobiyal ajana karşı direnç durumunun belirlenmesi, antibiyotik kombinasyonları ile sinerji elde edilip edilmeyeceğini göstermesi bakımından tedavi yöntemini belirlemeye yardımcı olacaktır. Bir veya birden fazla aminoglikozide yüksek düzeyli direnç gösteren enterokok izolatları artan sıklıkla bildirilmektedir (Teixeira vd., 2009; Channaiah vd., 2010).

2.3.1. β -laktam direnci

β -laktam direnci, *Enterococcus* cinsi bakterilerin tipik özelliğidir. Enterokoklar β -laktam antibiyotiklere karşı hem doğal hem de kazanılmış direnç gösterirler (Shepard ve Gilmore, 2002; Miller vd., 2014). Enterokoklar β -laktam antibiyotiklere karşı karakteristik olarak tolerans gösterirler. Yani tedavi

dozunda MİK oranı 32'nin üzerindedir. Bu da β -laktam antibiyotiklerin enterokoklara karşı bakterisidal değil, bakteriyostatik etkili olduğunu göstermektedir. Enterokoklar β -laktamlara genellikle streptokoklardan yaklaşık olarak 100 kat daha az duyarlıdır (Shepard ve Gilmore, 2002). Enterokokların iki ayrı direnç mekanizması ile β -laktam antibiyotiklere direnç kazandığı saptanmıştır. Bunlardan birincisi sıklıkla *E. faecium* suşlarında görülen, kromozomal olan ve penisilin afinitesinin azalması sonucu PBP 5'in miktarı ile orantılı olarak ortaya çıkan dirençtir (Derbentli, 1998). PBP5 sentez yeteneğinin kaybı, penisiline dirençli suşların, duyarlı hale gelmesine neden olmaktadır. İkinci direnç mekanizması ise β -laktamaz üretimidir. β -laktamaz üreten enterokoklar nadiren izole edilirler. β -laktamaz oluşturan suş ilk olarak 1981 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmıştır (Derbentli, 1998; Lefort vd., 2000). β -laktamaz üretimini kodlayan transfer edilebilir plazmid, aynı zamanda yüksek derecede gentamisin direncini de kodlamaktadır (Sood vd., 2008). Bu enzim Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından yaygın bir şekilde üretilir (Gülay, 2003).

2.3.2. Glikopeptid direnci

İlk defa enterokoklarda glikopeptidlere karşı direnci Uttley vd. (1988) bildirmiştir. Sonraki yıllarda ise tüm dünyada görülmeye başlanmıştır. Türkiye'de bildirilen ilk VRE bulgusu Tümer vd. (1998), tarafından bildirilmiştir. Vankomisin ve teikoplanin klinik enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan glikopeptid grubu üyesi antibiyotiklerdir. Nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilen enterokoklar arasında söz konusu bu antibiyotiklere dirençli suşlar tanımlanmıştır. Glikopeptid grubu antibiyotikler Gram pozitif bakterilerin sebep oldukları enfeksiyonların tedavisinde kullanılırken, Gram negatif bakterilerin lipid membranından penetre olamamaları nedeniyle, bu grup üzerinde etkili değildir. Bu sınıfa dahil olan antibiyotikler, çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizmalara karşı kullanılmalarının yanı sıra ampicilin ve penisilin gibi diğer antibiyotiklere karşı alerjik reaksiyonlar gösteren kişilerde de kullanıldıkları için klinik olarak büyük öneme sahiptirler. Aynı zamanda, glikopeptid antibiyotikler nozokomiyal

enfeksiyonlarda sıklıkla son tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadırlar (Giraffa, 2002).

Glikopeptid antibiyotikler, hücre duvarı sentezinde peptidoglikan polimerlerini oluşturacak öncül maddelerden olan D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanır ve hücre duvarı sentezini bozarlar. Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) ise ligaz enzimi ile D-ala-D-ala ucunun yapısını değiştirir ve D-ala-D-laktat veya D-ala-D-serin haline getirirler. Böylece bu uca vankomisinin bağlanma yeteneği çok azalır ve hücre duvarı sentezi devam eder. Günümüze kadar enterokok türlerinde glikopeptid direnci ile ilgili olarak *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* olmak üzere toplam 9 gen tanımlanmıştır (Miller vd., 2014). Önceleri fenotipik olarak, MİK değerlerine göre sınıflandırma yapılırken günümüzde ise spesifik ligaz genlerinin varlığına göre sınıflandırma yapılmaktadır (Garrido vd., 2014). VanA, VanB, VanD ve VanM tipi dirençte D-ala-D-ala-laktat; VanC, VanE, VanG, VanL ve VanN tipi dirençte ise D-ala-D-ala-serin sentezlenmektedir (Miller vd., 2014). Enterokoklardaki en iyi tanımlanmış direnç mekanizması ise VanA tipidir (Perez-Hernandez vd., 2002).

2.3.3. Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci

Makrolid, linkozamid ve streptograminler ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Bu antibiyotiklere karşı direnç, ribozomal RNA'nın metilasyonundan sorumlu *erm*(B) geni, asetiltransferaz enzimi ya da akış pompası mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Makrolid grubu antibiyotikler insanlarda çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakla birlikte özellikle eritromisin veya penisilin alerjisi olan hastalarda ilk seçenekler arasına girmektedir (Jensen vd., 1999).

2.3.4. Kinolon direnci

Kinolon direnci *gyrA* (giraz) ve *parC* (topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin ve enoksasin dahil enterokok suşlarının çoğunda orta seviyede görülmektedir (Li, 2005; Akçimen,

2010; Miller vd., 2014). Ancak çeşitli mekanizmalarla yüksek düzeyde direnç kazanabilir. Bakterisidal etki inokülüm miktarına bağlıdır. Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olan yeni florokinolon grubu antibiyotikler üretilmiştir. Bu yeni florokinolonlar arasında enterokoklara karşı en etkili olan ajan klinafloksasin olarak bulunmuştur (Cetinkaya vd., 2000). 20 µg/mL ampisilin ve 1 µg/mL klinafloksasin kombinasyonunun bakterisidal etkili olduğu gösterilmiştir (Gavaldá vd., 2003).

2.3.5. Kloramfenikol direnci

Enterokokların kloramfenikol direnci, asetiltransferazlar (yatay gen transferine sahip ve plazmidler tarafından kodlanan stafilokokal *cat* genleri) ve akış mekanizmasıyla ilişkilendirilmektedir. Enterokokların % 20-42'sinin kloramfenikole dirençli olduğu ve direnç mekanizmaları arasında en sık rastlananın kloramfenikol asetiltransferaz üretimi olduğu bildirilmiştir (Sardan, 2004).

2.3.6. Oksazolidinon direnci

Bu grubun ilk üyesi olan linezolidler, Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyel aktivite gösterir. VRE enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanan linezolidler; vankomisin, ampisilin, florokinolon, kloramfenikol, rifampin ve makrolidler gibi diğer antibiyotiklerle birlikte çoklu antibiyotik direnci gözlenen enterokokların tedavisinde kullanılmaktadır. Çoklu antibiyotik direnci gösteren enterokokların oluşturduğu enfeksiyonlarda, oksazolidinon grubu antibiyotik olan linezolid iyi bir alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (Garrido vd., 2014; Miller vd., 2014).

2.3.7. Rifampin direnci

Enterokokal enfeksiyonların tedavisinde çok kullanılmamasına rağmen, rifampin direnci enterokoklarda sık görülür. Bu duruma enterokok kaynaklı

olmayan enfeksiyonların tedavisinde rifampin kullanılmasının yanı sıra farklı faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir. Rifampin direncinin diğer bakteriyel enfeksiyonların tedavisi sırasında komensal mikrofloranın bu antibiyotiğe maruz kalmasından dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Rifampin, RNA polimerazın beta alt ünitelerini bağlayarak mRNA transkripsiyonunu engeller ve bakteri gelişimini inhibe eder (Garrido vd., 2014; Miller vd., 2014).

2.3.8. Tetrasiklin direnci

Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yolu ile kazanılan direncin en tipik örneğidir (Frazzon vd., 2010). Klinik kaynaklar ve hayvanlardan izole edilen enterokoklarda sıklıkla görülen tetrasiklin direnci ribozomun 30S alt ünitesine bağlanarak, aminoasıl-tRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe eder. Dirençten sorumlu *tetM*, *tetO*, *tetN* ve *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetL* geni bir plazmidde taşınır. Bu genler efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribozomal kaynaklı dirence de neden olabilir (Klare vd., 2003). Ayrıca rifampin, kinopristin-dalfopristin ve linezolid karşı da direnç gelişebilir (Robert ve Mollering, 2005).

2.3.9. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozid antibiyotikleri, aminoasitlere bağlanmış aminosiklitol çekirdeğine (streptamin, 2-deoksistreptamin veya streptidin) glikozidik bağlarla karakterize olan kompleks bir bileşiktir. Buna ek olarak, amino şekerlere bağlı olmayan bir aminosiklitol olan spektinomisin veya aminosiklitol foraminini içeren bileşikler gibi diğer bileşikler de bu ailenin içinde bulunur (Bryskier, 2005; Veyssier ve Bryskier, 2005). Aminoglikozidler öncelikle Gram negatif aerobik basiller, stafilokoklar ve diğer Gram pozitiflerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Yao ve Moellering, 2007). Bununla birlikte, aminoglikozidler Gram pozitiflere karşı kullanılırken, sinerjik etki gösterdikleri β -laktamlar veya vankomisin gibi diğer antibiyotikler ile

kombinasyon halinde kullanılması da önerilmektedir (Eliopoulos, 1989; Scaglione vd., 1995; Yao ve Moellering, 2007).

Aminoglikozid direnci aynı hücrede eş zamanlı olarak bulunabilen çeşitli mekanizmalar yoluyla oluşur. Açıklanan mekanizmalar, hedefin 16S rRNA veya ribozomal proteinlerin mutasyonu ile modifikasyonunu içermektedir (O'Connor vd., 1991; Galima vd., 2005). 16S rRNA'nın metilasyonu, birçok aminoglikozid üreten organizmada ve klinik suşlarda bulunan bir mekanizmadır (Galimand vd., 2005; Doi ve Arakawa, 2007).

Aminoglikozidler yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde, önemli tedavi yöntemlerinden biri olmuştur. Aminoglikozid direncinin artması ve yayılması ile etkinlikleri azalmıştır. Aminoglikozidlere karşı direnç gösteren pek çok bilinen mekanizma arasında enzimatik modifikasyon, klinik ortamda en yaygın olanıdır. Aminoglikozid modifiye edici enzimler (nükleotidiltransferazlar, fosfotransferazlar veya asetiltransferazlar) 2-deoksistreptamin çekirdeğinin veya şeker parçalarının farklı -OH ve -NH₂ gruplarındaki modifikasyonunu katalize ederler. Enterokoklarda aminoglikozid direnci 3 şekilde meydana gelmektedir. Birinci direnç sistemi bütün enterokoklarda görülür. Bu sistem enterokokların düşük hücresel geçirgenliği sayesinde aminoglikozidlere orta düzeyde doğal direnç göstermelerine neden olur. İkinci direnç mekanizmasında aktif eflux pompaları ile ilacın hücre dışına taşınması esasına dayanır. Üçüncü direnç mekanizmasında ise enterokoklar aminoglikozid modifiye edici enzimler ile antibiyotiği modifiye ederler. Bu durum enterokokların aminoglikozidlere karşı yüksek seviyede direnç göstermelerine neden olmaktadır (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Aminoglikozidlere karşı olan direnç MİK değeri $\geq 2000 \mu\text{g/mL}$ olduğu durumlarda yüksek seviye dirençten bahsedilmektedir. Yüksek düzey antibiyotik direnci 30S ribozomal alt birimine ait proteinlerin sentezinin etkilediği mutasyonlar nedeniyle görülmektedir. Yüksek düzey direnç antibiyotik moleküllerini inaktive edebilen enzim üretimi ile sağlanır. Yüksek düzeyde aminoglikozid direncini saptamak için disk difüzyon, agar dilüsyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır (Murray, 1998; Çetinkaya vd., 2000; Ramirez ve Tolmasky, 2010).

Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direncinin çıkışı streptomisin ile ilgilidir (Garrido vd., 2014). Streptomisin direnci streptomisin adeniltransferaz üretimiyle ilişkilidir ve streptomisin direncine sahip kültürler gentamisine karşı duyarlı kalmaktadır (Çetinkaya vd., 2000; Sood vd., 2008). Streptomisine karşı yüksek seviye direnç ($MIC \geq 2000 \mu g/mL$) ribozomal olarak da gerçekleşebilir yani ribozomların streptomisin inhibisyonuna dirençli hale geldiği bir mutasyondan kaynaklanabilmektedir. Streptomisin dışındaki aminoglikozidlere karşı yüksek düzey dirençten genelde iki fonksiyonlu enzim olan ve gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin ile kanamisin direnç oluşumunu sağlayan 6'asetil transferaz- 2''fosfotransferaz -AAC(6')-APH(2'')-enzimi sorumludur. Gentamisin direnci, streptomisin hariç diğer aminoglikozidlere olan direncin iyi bir göstergesidir. Bu direnç sıklıkla iki fonksiyonel ilmeğe sahip enzimin üretimi sonucu şekillenmektedir. Bu domainlerden biri 2''-fosfotransferaz aktivitesine diğeri ise 6'-asetiltransferaz aktivitesine sahiptir. Bu kombine enzimatik aktivite yüksek seviyede dirence ve/veya streptomisin hariç ticari olarak piyasada olan tüm aminoglikozidlere sinerjik dirence neden olur. Bu çift fonksiyonel enzimi kodlayan *aph(2'')-Ia/aac(6')-Ie* direnç geninin daha önce stafilokoklardaki gentamisin direnç geninin sekansıyla aynı olduğu belirlenmiştir (Courvalin vd., 1980). Bu nedenle enterokoklardaki gentamisin direncinin stafilokoklardakiyle aynı transpozon üzerinden kodlandığı düşünülmektedir. Enterokoklar gentamisin ve streptomisine karşı farklı şekillerde direnç gösterdiğinden, antibiyotik direnç testlerinde iki antibiyotiğin de incelenmesi önem taşımaktadır (Murray, 1998).

Periplazmik aralık veya sitoplazmada yerleştirilmiş en az 12 aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) tanımlanmıştır. Enzimler ekstraselüler olarak salınmazlar ve hücre içine girmemiş antibiyotikleri etkilemezler. Bunlar esas olarak amino gruplarını asetile eden üç asetiltransferaz olan AAC(2'), AAC(3), AAC(6'); hidroksil gruplarını adenile eden dört adeniltransferaz olan ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) ve hidroksil gruplarını fosforile eden beş fosfotransferaz olan APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(6), APH(5'') enzimleridir. Bu enzimler antibiyotikleri kesin olarak inaktive etmezler; fakat aminoglikozidlerin hücre içine girişlerini zayıflatırlar ve ribozomlara

bağlanmalarını inhibe ederler (Lortholory vd., 1995). Aminoglikozid modifiye edici enzimlerden aminoglikozid N-asetiltransferazlar (AAC'ler), yaklaşık 10.000 protein içerir. N-asetiltransferaz enzimleri, alıcı molekül içindeki -NH₂ gruplarını asetil koenzim A'yı verici substrat olarak kullanarak katalize ederler. AAC'ler, 1 [AAC(1)], 3 [AAC(3)], 2 '[AAC(2')]' veya 6 '[AAC(6')]' konumlarındaki asetilasyon katalizörünü oluştururlar (Vetting vd., 2005). AAC(6') enzimleri en yaygın olanıdır, Gram negatiflerde olduğu kadar Gram pozitiflerde de bulunurlar (Centron ve Roy, 2002). Aminoglikozid O-nükleotidiltransferazlar (ANT'ler) ise, aminoglikozid molekülündeki bir AMP grubunun donör substrat ATP'den ve hidroksil grubundan transferini katalizleyerek aminoglikozidlerin inaktivasyonuna aracılık ederler. 6 [ANT(6)], 9 [ANT(9)], 4 '[ANT(4')]', 2 "[ANT(2'')]" ve 3 "[ANT(3'')]" adenilasyonunu katalize eden beş ANT sınıfı vardır (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Bunlardan ANT(3'') enzimi en yaygın bulunan ANT enzimidir (Hollingshead ve Vapnek, 1985). Aminoglikozid modifiye edici enzimlerden aminoglikozid O-fosfotransferazlar (APH'ler), bir fosfat grubunun aminoglikozid molekülüne transferini katalize ederler. Bahsedilen sınıflar şunlardır: APH(4), APH(6), APH(9), APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(7'') (Wright ve Thompson, 1999). Bunların içinden APH(2'') enzimi Gram pozitiflerde gentamisine dirençte önemli bir rol oynamaktadır (Toth vd., 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tavuk eti örnekleri

Tez çalışması kapsamında biyomateryal olarak kullanılan yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel *Enterococcus* cinsi suşların izole edildiği tavuk eti örnekleri Isparta ve Antalya ilinde bulunan kasap ve marketlerden 2017 yılı Haziran-Ağustos aylarını kapsayan 3 aylık zaman aralığında temin edilmiştir.

3.1.2. Mikroorganizmalar

Çalışma kapsamında Isparta ve Antalya illerinden temin edilen 112 tavuk eti (39 kanat, 37 göğüs, 20 but, 16 baget) örneğinden izole edilen 32 YSAD muhtemel *Enterococcus* suşu kullanılmıştır. İzole edilen muhtemel enterokok suşları; de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, LAB M, Lancashire, İngiltere) besiyeri ortamına % 20 oranında steril gliserol (Riedel-de Haën, Seelze, Almanya) ilave edilerek stok tüplerinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma materyalleri ise gliserol ilave edilmemiş MRS broth besiyeri ortamında +4 °C'de ve haftalık pasajlamalar yapılarak muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel *Enterococcus* suşlarının izolasyonu

YSAD *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için her bir tavuk eti örneğinden 25 g aseptik koşullar altında tartılmış ve steril çelik blenderda (Waring Commercial 8011 ES, Torrington, CT, Amerika Birleşik Devletleri), 225 mL fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisi (FTS, % 0.85 NaCl, w/v) ile homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan bu ilk dilüsyondan mikropipet

yardımı ile 100 µL alınarak yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için 500 µg/mL gentamisin ve yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için ise 2000 µg/mL streptomisin içeren iki farklı Enterococcosel Agar (Becton Dickinson, Almanya) besiyeri ve MRS Agar besiyeri ortamlarına aktarılmış ve Drigalski spatülü ile Petri yüzeyine yayma işlemi yapılmıştır. Petri kutuları 37 °C'de 2-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Enterococcosel agar ortamında siyah renkte zon veren ve MRS agar ortamında ise gelişme gösteren bütün koloniler YSGD/YSSD muhtemel *Enterococcus* izolatu olarak düşünülmüş ve çalışma materyali olarak izole edilmiştir. Daha sonra koloniler izole edildikleri konsatrasyonda gentamisin veya streptomisin ilave edilmiş MRS broth besiyeri ortamında kültüre edilmiştir. İzolatların saflık kontrolleri Enterococcosel agar besiyeri ortamında yapılmıştır.

3.2.2. YSAD izolatların cins düzeyinde tanısı

3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi

Seçilen izolatların mikroskopik morfolojileri Gram boyama yöntemiyle hazırlanan preparatların 1000 X büyütme ile ışık mikroskopunda (Leica DM500, Almanya) incelenmesi sonucunda tespit edilmiştir. Katalaz testi için katı besiyeri ortamında gelişen koloni üzerine bir damla % 3 derişimde H₂O₂ damlatılıp gaz çıkışı olup olmadığı izlenmiştir. Gaz çıkışı gözlenmeyen örnekler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Katalaz testlerinde pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, negatif kontrol olarak ise *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır. Referans kültürler Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.2.2.2. Kültürel testler

YSAD muhtemel enterokok izolatları MRS broth ortamında 37 °C'de 18 saat geliştirildikten sonra % 6.5 NaCl ilave edilerek ve pH'sı 9.6'ya ayarlanarak hazırlanan iki ayrı MRS broth ortamına inoküle edilmiş ve 37 °C'de 18 saat kültüre edilmiştir (Manero ve Blanch, 1999). Bu testlere ek olarak izolatların MRS broth ortamında 10 °C ve 45 °C'de gelişme özellikleri de incelenmiştir. Ayrıca izolatların 60 °C'de 30 dakika sıcaklık uygulamasına dirençleri tespit edilmiştir (Morandi vd., 2006).

3.2.2.3. İzolatların *Enterococcus* cinsine özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı

3.2.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için YSAD muhtemel enterokok izolatları MRS broth ortamında 37 °C'de 18 saat süre ile geliştirilmiş ve bu kültürlerden steril Eppendorf tüplerine 0.5 mL aktarılmıştır. Hücrelerin çöktürülmesi için tüpler 13000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya). Üst fazlar dökülmüş ve hücre çökeltileri üzerine 0.5 mL liziz çözeltisi ilave edilerek tüp karıştırıcıda (Velp Scientifical, Wizard X, İtalya) çözülmüştür. Daha sonra tüpler su banyosu (Nüve NB9, Türkiye) içerisinde 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, % 10 w/v) ilave edilmiş ve 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika tutulmuştur. İnkübasyon sonrası lize olan hücre süspansiyonları üzerine 0.7 mL fenol-kloroform (1:10) ilave edilerek 13000 rpm devirde 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst faz alınarak yeni steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 0.7 mL 2-propanol ilave edildikten sonra tüpler bir kez daha 13000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan çökelti 50 µL Tris-EDTA (pH 8.0) içerisinde çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Cancilla vd., 1992).

Liziz Çözeltisi

NaCl	250	mM
EDTA	10	mM
Tris HCl	10	mM
Lizozim	100	mg
Destile su	50	mL
pH 8.0± 0.02		

SDS (% 10)

SDS	10	g
Destile su	100	g

Tris-EDTA

Tris	0.121	g
EDTA	0.037	g
Destile su	100	mL
pH 8.0± 0.02		

3.2.2.3.2. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi

Genomik DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 (w/v) agaroz içeren jellerde yapılmıştır. Agaroz 150 mL tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde Arçelik MD 565 S, (Türkiye) mikrodalga fırında eritilmiştir ve hazırlanan ortamın oda sıcaklığında soğuması beklendikten sonra yatay elektroforez jel sistemine dökülmüştür (Thermo Fisher Scientific OWL EASYCAST B2, Amerika Birleşik Devletleri). Daha sonra, jel tarağı yerleştirilerek jelin polimerizasyonu için 30-45 dakika beklenmiştir. Jelin polimerize olmasının ardından jelin üzerini kapatacak biçimde elektroforez tankına tris-asetat tamponu ilave edilmiş ve tarak jele zarar vermeden uzaklaştırılmıştır. 10 µL genomik DNA örneği, 2 µL marker boya çözeltisi ile karıştırılmış ve mikropipet yardımıyla örneğin tamamı jel kuyularına aktarılmıştır. Elektroforez işlemi, 85 voltta 1.5-2 saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda elektrik akımı kesilmiş ve ortamdan alınan jel, kullanılan elektroforez

tamponunun yeni hazırlanmış 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, ABD) içeren çözeltisinde 45 dakika boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jeller, 312 nm dalga boyunda ultraviyole ışık (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) altında incelenerek fotoğrafı Nikon D5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Corp. Japonya) kullanılarak çekilmiştir.

Tris-Asetat Tamponu (1X)

Tris	4.84	g
Sodyum asetat	4.08	g
EDTA	0.37	g
Destile su	100	mL
pH 8.0 ± 0.02		

Marker Boya

Brom fenol blue	0.25	g
Sakkaroz	40	g
Destile su	100	mL

3.2.2.3.3. YSAD izolatların cinse özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı

YSAD izolatların cins düzeyinde tanısı *Enterococcus* cinsine özgü Ent-1: 5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3' ve Ent-2: 5'-AACTTCGTCACCAACGCGAAC-3' primer çifti kullanılarak TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazında (Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) yapılmıştır. PZR işlemi Çizelge 3.1' de verilen PZR karışımı kullanılarak aşağıda verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir (Sahoo vd., 2015).

95 °C	15 dk	}	1 döngü
95 °C	15 sn		40 döngü
62 °C	1 dk		
72 °C	30 sn		
72 °C	10 dk		1 döngü

Çizelge 3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı

Madde adı	Hacim
PCR master mix (Thermo #K0171, ABD)	25 µL
İleri primer	1 µL
Geri primer	1 µL
Genomik DNA	3 µL
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 µL
Toplam hacim	50 µL

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin elektroforezi OWL EASYCAST B2 (Thermo) yatay elektroforez tankında % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış ve fragment büyüklükleri O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo #SM1153) kullanılarak hesaplanmıştır. Jeller etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır.

3.2.3. YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısı

3.2.3.1. Türe özgü primerler ile tür düzeyinde tanı

YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında Jackson vd. (2004) tarafından önerilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii* türlerine özgü primer çiftleri kullanılmıştır. *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında kullanılan primer dizileri ve ürün büyüklükleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. PZR işlemi Çizelge 3.1'de verilen PZR karışımı kullanılarak iki farklı PZR protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. hirae* türlerinin tanısında protokol 1 ve *E. mundtii* türünün tanısında ise protokol 2 uygulanmıştır. PZR denemelerinde Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 51559, *E. durans* NYE4, *E. casseliflavus* DYE1 ve *E. gallinarum* DYE26 suşları kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri

Tür	Primer dizisi (5' - 3')	Ürün boyutu (bp)
<i>E. casseliflavus</i>	TCCTGAATTAGGTGAAAAAC GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288
<i>E. durans</i>	CCTACTGATATTAAGACAGCG TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295
<i>E. faecalis</i>	ACTTATGTGACTAACTTAACC TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	360
<i>E. faecium</i>	GAAAAACAATAGAAGAATTAT TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	215
<i>E. gallinarum</i>	TTACTTGCTGATTTTGATTCTG TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	173
<i>E. hirae</i>	CTTTCTGATATGGATGCTGTC TAAATTCTTCCTTAAATGTTG	187
<i>E. mundtii</i>	CAGACATGGATGCTATTCCATCT GCCATGATTTTCCAGAAGAAT	98

Protokol 1

95 °C	4 dk	1 döngü
95 °C	30 sn	} 30 döngü
55 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	7 dk	1 döngü

Protokol 2

95 °C	4 dk	1 döngü
95 °C	30 sn	} 30 döngü
60 °C	1 dk	
72 °C	1 dk	
72 °C	7 dk	1 döngü

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi OWL EASYCAST B2 (Thermo) yatay elektroforez tankında % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemini takiben jeller etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo) kullanılmıştır.

3.2.3.2. Türe özgü primerler ile tanısı yapılamayan *Enterococcus* izolatlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı

Türe özgü spesifik primer kullanılarak tür düzeyinde tanısı yapılamayan 3 izolatın (MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1) tür düzeyinde tanısı 16S rDNA dizi analizi ile yapılmıştır. PZR işlemi TurboCyler 2 gradient termal döngü cihazında (Blue-Ray Biotech) gerçekleştirilmiştir. Enterokok suşlarında 16S rDNA bölgesi, Edwards vd. (1989) tarafından önerilen pA (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' genel bakteri primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR işlemi Çizelge 3.1'de verilen PZR karışımı kullanılarak aşağıda belirtilen protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

94 °C	120 sn		1 döngü
94 °C	30 sn	}	30 döngü
55 °C	60 sn		
72 °C	90 sn		
72 °C	10 dk		1döngü

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi yatay elektroforez tankında % 1 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemini takiben jeller etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo) kullanılmıştır. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. (ODTÜ, Teknokent, Ankara, Türkiye)'inde yaptırılmıştır. Sekans işleminde Applied Biosystems® AB 3730XL (Thermo Fisher Scientific, ABD) otomatik gen sekans cihazı kullanılmıştır. 16S

rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.4. YSAD *Enterococcus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi

MRS broth besiyerinde 37 °C’de 18 saat geliştirilen YSAD *Enterococcus* kùltürlerinden 2’řer mL alınarak steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve tüpler 13000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148). Santrifüj işleminin ardından üřt faz dökülmüş ve kalan çökelti 1 mL fosfat tampon (PBS) ile yıkanmıştır. PBS ile yıkama işlemi iki kez tekrar edilmiş ve Eppendorf tüpleri tekrar 13000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan üřt faz dökülmüş ve çökelti tekrar 1 mL PBS içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan hücre süspansiyonlarının yoğunluğu PBS kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklık standardına ayarlanmıştır. Standardize edilen hücre süspansiyonlarından 150 mL alınarak Mueller Hinton agar (LAB M) besiyerine yayılmış ve üzerlerine ampicilin (10 µg), doksisiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (120 µg), kloramfenikol (30 µg), levofloksasin (5 µg), linezolid (30 µg), minosiklin (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloksasin (10 µg), penisilin G (10 U), quinupristin/dalfopristin (15 µg), rifampin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), streptomisin (300 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg) ve vankomisin (30 µg) içeren antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Bu işlemin ardından Petri kutuları 37 °C’ de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapları kumpas yardımıyla ölçölmüştür (Cariolato vd., 2008). Enterokok suşlarının antibiyotik direnci ve duyarlılığı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü’nün (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2016 yılı klavuzuna göre değerlendirilmiştir.

Fosfat Tampon (PBS)

NaCl	0.8	g
KCl	0.02	g
Na ₂ PO ₄	0.144	g
KH ₂ PO ₄	0.024	g
Destile su	100	mL
pH 7.4 ± 0.02		

3.2.5. YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmesi

İzolatların streptomisin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Gentamisin ve streptomisin stok çözeltileri 96 kuyucuklu steril polistren mikrotitre tabaklarda (LP Italiano L120138, İtalya) Brain Heart Infusion broth (BHI, LAB M) besiyeri ile 2 kat seyreltme işlemi uygulanarak 0.125-4096 µg/mL konsantrasyon aralığında dilüe edilmiştir. Daha sonra dilüe antibiyotik içeren kuyucuklara BHI broth besiyeri ortamı ile 1:10 oranında dilüe edilen aktif test kültüründen (BHI broth ortamında ardışık 2 pasaj yapılarak geliştirilmiş) 5'er µL inoküle edilmiştir. Kültür inokülasyonunu takiben mikrotitre tabaklar 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Denemelerde kültür gelişimini gözlemlemek amacıyla antibiyotik ilave edilmemiş kuyucuklar (BHI broth içeren) kontrol olarak kullanılmıştır. MİK testinde *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 51559 ve *E. faecalis* ATCC 51299 suşları referans kültür olarak kullanılmıştır. Enterokok suşlarının MİK değerleri CLSI'nin 2016 ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)'nin 2018 yılı klavuzlarına göre değerlendirilmiştir.

3.2.6. YSAD *Enterococcus* izolatlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) geni varlığının PZR ile araştırılması

YSAD *Enterococcus* izolatlarında yüksek seviyede gentamisin ve streptomisin direnci ile ilişkili aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) geni varlığının PZR ile araştırılmasında Çizelge 3.3.'de verilen primer setleri kullanılmıştır. İzolatlarda gentamisin direnci için *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genlerinin, streptomisin direnci için ise *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genlerinin varlığı araştırılmıştır (Vakulenko vd., 2003; Niu vd., 2016). PZR işlemi Çizelge 3.1'de verilen PZR karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR denemelerinde *aph(3')-IIIa* ve *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genlerinin tespiti için protokol 1 (Vakulenko vd., 2003) ve *ant(6')-Ia* geninin tespiti için protokol 2 (Niu vd., 2016) kullanılmıştır.

Protokol 1

94 °C	3 dk	1 döngü
94 °C	40 sn	} 35 döngü
55 °C	40 sn	
72 °C	40 sn	
72 °C	2 dk	1döngü

Protokol 2

94 °C	3 dk	1 döngü
94 °C	30 sn	} 35 döngü
56 °C	30 sn	
72 °C	1 dk	
72 °C	5 dk	1 döngü

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi OWL EASYCAST B2 (Thermo) yatay elektroforez tankında % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış, etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. PZR fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo) kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. *Enterococcus* suşlarında AME genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri

Antibiyotik	Gen	Primer sekansı (5'-3')	Ürün boyutu (bp)	Kaynaklar
Gentamisin	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	Vakulenko vd., 2003
	<i>aph(2'')-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	Vakulenko vd., 2003
	<i>aph(2'')-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	Vakulenko vd., 2003
	<i>aph(2'')-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	Vakulenko vd., 2003
Streptomisin	<i>aph(3')-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	Vakulenko vd., 2003
	<i>ant(4')-Ia</i>	CAAAGTGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	Vakulenko vd., 2003
	<i>ant(6')-Ia</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCCGCCACCTCACCG	577	Niu vd., 2016

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) Muhtemel *Enterococcus* Suşlarının İzolasyonu ve Cins Düzeyinde Tanısı

Tez çalışması kapsamında kullanılan yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel *Enterococcus* suşları, Isparta ve Antalya illerinden temin edilen 112 tavuk eti (39 kanat, 37 göğüs, 20 but, 16 baget) örneğinden izole edilmiştir. Yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için 500 µg/mL gentamisin, yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için ise 2000 µg/mL streptomisin içeren Enterococcosel agar ve MRS agar besiyeri ortamları kullanılmıştır. Enterococcosel agar ortamında etrafında siyah renkte zon veren ve MRS agar ortamında ise gelişme gösteren toplam 45 koloni YSGD/YSSD (18/27) muhtemel *Enterococcus* izolatu olarak düşünülmüş ve öze yardımıyla alınarak aynı konsatrasyonda gentamisin veya streptomisin içeren MRS broth ortamlarında kültüre edilmiştir. Seçilen 45 izolattan 8'i 500 µg/mL gentamisin ve 1'i ise 2000 µg/mL streptomisin içeren MRS broth ortamında gelişme göstermemiştir. Kültüre edilebilen 36 izolatin (10 YSGD ve 26 YSSD) KAA agarda saflık kontrollerini takiben stok kültürleri hazırlanmıştır.

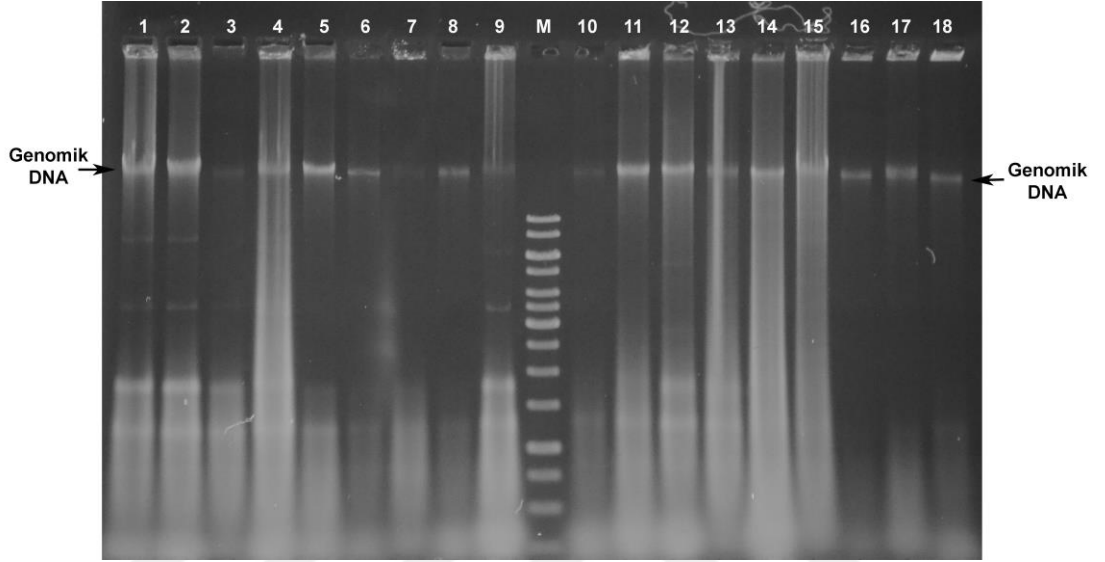
İzolatların cins düzeyinde tanısı klasik (Gram boyama, katalaz testi ve kültürel testler) ve moleküler yöntemlerle yapılmıştır. İzolatların mikroskopik morfolojisi Gram boyama yöntemi ile incelenmiş ve Gram boyama sonrası 32 izolatin Gram pozitif kok (monokok, diplokok ve kısa zincir), 2 izolatin Gram negatif kok/kokobasil, 1 izolatin Gram pozitif basil, 1 izolatin ise Gram negatif basil morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir. Gram boyama sonucu Gram negatif (3 izolat) ve Gram pozitif basil morfolojisinde (1 izolat) olduğu tespit edilen izolatlar (4) *Enterococcus* cinsi üyesi olmadığı düşünülerek elimine edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında Gram pozitif kok morfolojisine (monokok, diplokok ve kısa zincir) sahip 32 koloni (7 YSGD ve 25 YSSD) ile devam edilmiştir. Katalaz testi sonucu 32 YSAD izolatinın tamamının katalaz negatif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Kültürel testler sonucu ise, 32 YSAD

izolatın 10 °C, 37 °C ve 45 °C inkübasyon sıcaklığında, pH'sı 9.6'ya ayarlanmış ve % 6.5 NaCl içeren MRS besiyeri ortamlarında gelişme gösterebildiği (MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1 nolu izolatlar % 6.5 NaCl içeren MRS brothda zayıf gelişme gösterdi) ve ayrıca 60 °C'de 30 dakika sıcaklık uygulamasına karşı da dirençli olduğu belirlenmiştir. Klasik tanı yöntemlerinden elde edilen bilgiler ışığında tavuk eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD izolat *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanmıştır. Gentamisin içeren MRS agar ortamından alınan kolonilere MGM, Enterococcosel agar ortamından alınan kolonilere ise MGE kodu verilmiştir. Benzer olarak streptomisin içeren MRS agar ortamından alınan kolonilere MSM, Enterococcosel agar ortamından alınan kolonilere ise MSE kodu verilmiştir. Çalışma kapsamında izolasyon yapılan tavuk eti örnekleri, temin edildiği iller ve izolat kodları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında izolasyon yapılan tavuk eti örnekleri, temin edildiği iller ve izolat kodları

Tavuk eti	Temin edildiği il	İzolat kod
Göğüs	Isparta	MGE13.1, MGE13.2, MGE13.3, MGE13.4
Göğüs	Isparta	MSM14.1
Kanat	Isparta	MSM31.1
Göğüs	Isparta	MSE53.1, MSM53.1
Göğüs	Isparta	MGE58.1, MSE58.1
But	Isparta	MSE61.1
Kanat	Isparta	MGE63.1, MSE63.1, MSE63.2
Kanat	Antalya	MSM76.1
Kanat	Antalya	MSM93.1
Kanat	Antalya	MSM95.1
But	Antalya	MSM103.1
But	Antalya	MSE104.1, MSE104.2, MSM104.1
But	Antalya	MSM105.1
Kanat	Antalya	MSM106.1
But	Antalya	MSM107.1
But	Antalya	MSM108.1
Göğüs	Isparta	MSM109.1
Kanat	Isparta	MSM110.1
Kanat	Isparta	MGM111.1, MSE111.1, MSE111.2
Baget	Isparta	MSM112.1, MSM112.2

İzolatların cins düzeyinde tanısı *Enterococcus* cinsine özgü primerler çiftinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi ile doğrulanmıştır. Bu amaçla izolatların Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle göre genomik DNA örnekleri izole edilmiştir. İzolatlara ait genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. YSAD muhtemel *Enterococcus* izolatlarının genomik DNA örnekleri

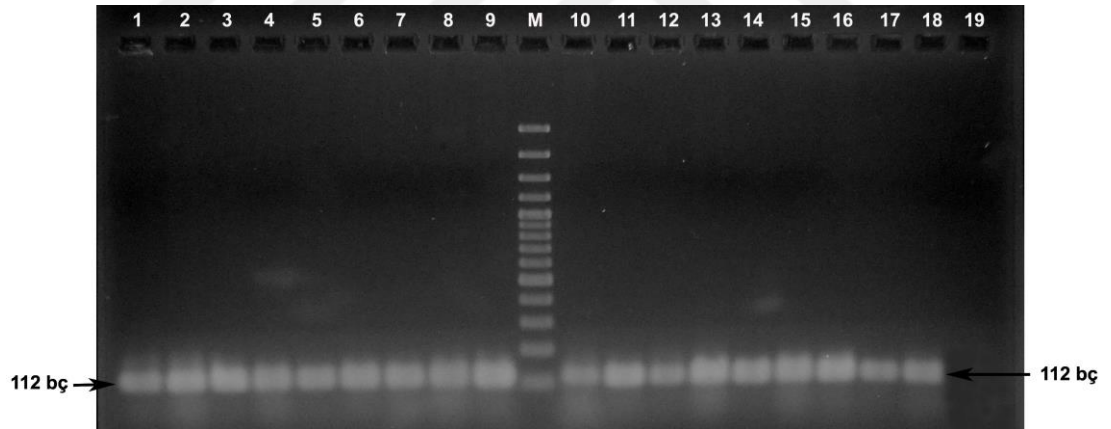
1-18 YSAD izolatların genomik DNA’ sı

M O’GeneRuler DNA Marker (bç): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250

Cinse özgü PZR denemesi sonucu 32 YSAD izolatın tamamının *Enterococcus* cinsine özgü primerler ile beklenildiği gibi 112 kb büyüklüğünde fragmentler verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bu sonuçlar klasik tanı testi sonuçlarını desteklemiş ve YSAD izolatların tamamının *Enterococcus* cinsi üyesi olduğu doğrulanmıştır. *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanan 32 YSAD izolat çalışma materyali olarak seçilmiştir.

Enterococcus spp. kanatlılarda bulunabilen ve dünya genelinde yayılım gösteren bir bakteridir. Enterokoklar evcil hayvanlarda enterit, sepsis, mastitis, solunum ve üriner sistem hastalıklarına neden olan bakteriler olarak

bilinmektedirler. Enfeksiyonlar evcil hayvanlardan tavuklarda endokardit şeklinde görülmektedir (Songer ve Post, 2015). *Enterococcus* spp. kanatlı hayvanların doğal konakçısıdır. Ayrıca kanatlıların yaşadıkları çevre ve doğada da bulunabilmektedirler. Her ne kadar *Enterococcus* spp. kanatlıların bağırsak sisteminin doğal konakçısı olsalar da sadece birkaç enterokok türü kanatlı altlığından izole edilebilmektedir (Barnes vd., 2008). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da tavuk eti örneklerinden enterokok cinsi üyesi suşlar izole edildiği rapor edilmiştir (Bakarat vd., 2000, Kasımoğlu-Doğru vd., 2010; Dilik ve Doğru, 2010; Bayram vd., 2011; Şahin, 2012; Yıldız, 2012; Terkuran, 2013; Klibi vd., 2013; Muş, 2014, Diken, 2016, Onaran, 2017; Sanlibaba vd., 2018,). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda tavuk etinden izole edilen *Enterococcus* izolatları arasında yüksek seviyede aminoglikozid dirençli suşların varlığı tespit edilmiştir (Donabedian vd., 2003; Yıldız, 2012; Muş, 2014; Onaran, 2017; Kim vd., 2018; Sanlibaba vd., 2018).

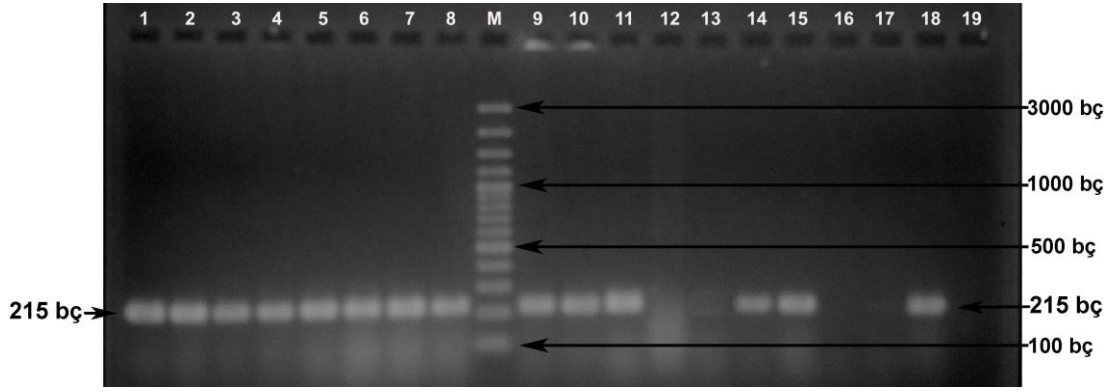


Şekil 4.2. YSAD izolatların *Enterococcus* cinsine özgü primerler ile çoğaltılan PZR fragmentleri

1-17	YSAD izolatların PZR fragmentleri	
18	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 (pozitif kontrol)	
19	Su (negatif kontrol)	
M	M O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000 , 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100 bç

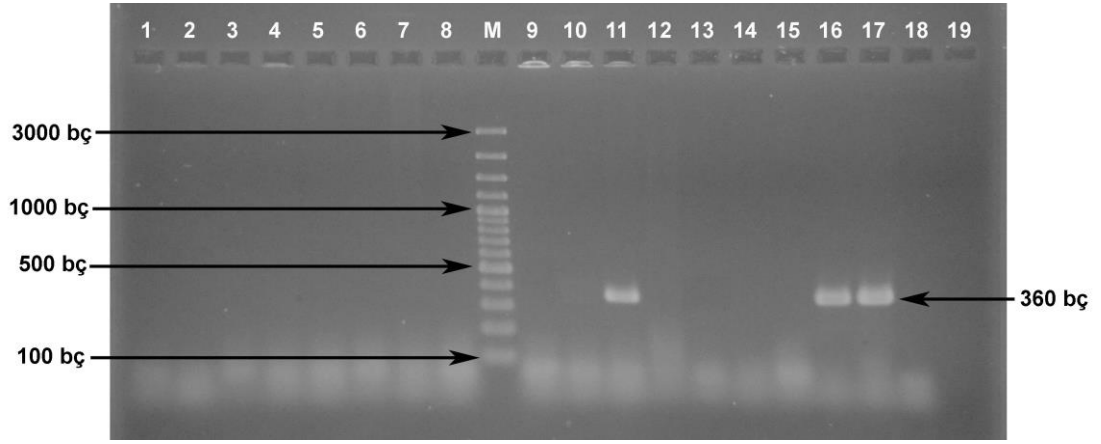
4.2. YSAD *Enterococcus* İzolatlarının Tür Düzeyinde Tanısı

Tez çalışması kapsamında izole edilen YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısı türe özgü primerler ve 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii* türlerine özgü primer çiftleri kullanılmıştır. Türe özgü primerler kullanılarak yapılan tür düzeyinde tanı testleri sonucu tavuk etinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'i *E. faecium*, 5'i *E. faecalis*, 5'i *E. durans*, 1'i *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. Türe özgü primerler kullanılarak yapılan PZR denemesi sonucu *E. faecium* için 215 kb (Şekil 4.3), *E. faecalis* için 360 kb (Şekil 4.4), *E. durans* için 295 kb ve *E. casseliflavus* için ise 288 kb büyüklüğünde fragmentler elde edilmiştir. Üç izolat ise tez çalışması kapsamında kullanılan türe özgü primerler ile tanımlanamamıştır. Tür düzeyinde tanısı yapılamayan 3 izolat (MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1) 16S rDNA dizi analizi ile tanımlanmıştır. Dizi analiz sonucu 3 izolatında *E. avium* genomu ile % 99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında tavuk eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'i *E. faecium* (% 56.25), 5'i *E. faecalis* (% 15.63), 5'i *E. durans* (% 15.63), 3'ü *E. avium* (% 9.37) ve 1'i *E. casseliflavus* (% 3.12) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3. YSAD *Enterococcus* izolatlarının *E. faecium*'a özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı

1	MSM95.1	: 215 bç
2	MSM103.1	: 215 bç
3	MSM104.1	: 215 bç
4	MSE104.1	: 215 bç
5	MSE104.2	: 215 bç
6	MSM105.1	: 215 bç
7	MSM106.1	: 215 bç
8	MSM107.1	: 215 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000 , 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100 bç
9	MSM108.1	: 215 bç
10	MSM109.1	: 215 bç
11	MSM110.1	: 215 bç
12	MGM111.1	: -
13	MSE111.1	: -
14	MSE111.2	: 215 bç
15	MSM112.1	: 215 bç
16	MGM112.1	: -
17	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (negatif kontrol)	: -
18	<i>E. faecium</i> ATCC 51559 (pozitif kontrol)	: 215 bç
19	Su (negatif kontrol)	: -



Şekil 4.4. YSAD *Enterococcus* izolatlarının *E. faecalis*'e özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı

1	MSM95.1	: -
2	MSM103.1	: -
3	MSM104.1	: -
4	MSE104.1	: -
5	MSE104.2	: -
6	MSM105.1	: -
7	MSM106.1	: -
8	MSM107.1	: -
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000 , 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100 bç
9	MSM108.1	: -
10	MSM109.1	: -
11	MSM110.1	: 360 bç
12	MGM111.1	: -
13	MSE111.1	: -
14	MSE111.2	: -
15	MSM112.1	: -
16	MGM112.1	: 360 bç
17	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (pozitif kontrol)	: 360 bç
18	<i>E. faecium</i> ATCC 51559 (negatif kontrol)	: -
19	Su (negatif kontrol)	: -

Çizelge 4.2. Tavuk etlerinden izole edilen *Enterococcus* suşlarının tür düzeyinde tanısı

İzolat kodu	Bakteri Türü
MGE13.1	<i>Enterococcus durans</i>
MGE13.2	<i>Enterococcus durans</i>
MGE13.3	<i>Enterococcus durans</i>
MGE13.4	<i>Enterococcus durans</i>
MSM14.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM31.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSE53.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM53.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
MSE58.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MGE58.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
MSE61.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
MGE63.1	<i>Enterococcus durans</i>
MSE63.1	<i>Enterococcus avium</i>
MSE63.2	<i>Enterococcus avium</i>
MSM76.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM93.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
MSM95.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM103.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM104.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSE104.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSE104.2	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM105.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM106.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM107.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM108.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM109.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM110.1	<i>Enterococcus faecium</i>
MGM111.1	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
MSE111.1	<i>Enterococcus avium</i>
MSE111.2	<i>Enterococcus faecium</i>
MSM112.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
MSM112.2	<i>Enterococcus faecium</i>

Tez çalışması kapsamında izole edilen YSAD *Enterococcus* türleri arasında baskın türün *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir. Tavuk ile ilişkili örneklerden (et, deri, dışı vb.) *Enterococcus* izolasyonu ve antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda bu bulguyu destekler niteliktedir (Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Dilik ve Doğru, 2010; Kasımoğlu-Doğru vd., 2010; Sanlibaba, 2018). Ticari broiler işletmelerinden 400, köy tavuklarından 304 kloakal swap örneklerinden izolasyon ve

identifikasyon çalışmaları sonucuna göre enterokok suşlarının % 54.3'ünün *E. faecium*, % 22.3'ünün *E. gallinarum*, % 14.7'sinin *E. faecalis*, % 4.3'ünün *E. mundtii*, % 1.6'sinin *E. casseliflavus*, % 1'inin *E. raffinosus*, % 1'inin *E. durans*, % 0.2'sinin *E. solitarius* ve % 0.2'sinin *E. hiraе* türlerine ait olduğu belirlenmiştir (Dilik ve İstanbulluoğlu., 2010). Türkiye'deki tavuk popülasyonlarında yapılan çalışmalarda en sık izole edilen enterokok türlerinin *E. faecium* (% 60) ve *E. faecalis* (% 34) olduğu bildirilmiştir (Dilik ve Doğru, 2010). Kasımoğlu-Doğru vd. (2010), 106 boyun derisi örneğinden izole ettikleri 83 *Enterococcus* suşunun % 48'ini *E. faecium*, % 23'n *E. durans* ve % 19'unu *E. faecalis* olarak tanımlamışlardır. Van ili ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklardan 500 dışkı rneği toplanmış ve izolatların 110'u (% 57.3) *E. faecium*, 41'i (% 21.3) *Enterococcus faecalis*, 27'si (% 14.1) *E. hiraе*, 9'u (% 4.7) *E. casseliflavus/gallinarum* ve 5'i (% 2.6) *E. durans* olarak tanımlanmıştır (Akgl vd., 2016). Ankara'da paketlenmiş 122 tavuk örneklerinden izole edilen *Enterococcus* suşlarından toplam 97 şüpheli enterokok izolatu tanımlanmış ve 16S rDNA sekans analizi sonucu izolatların % 61.85'inin *E. faecium* ve % 38.15'inin ise *E. faecalis* olduğu rapor edilmiştir (Sanlibaba vd., 2018). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da tezde elde edilen bulgulara benzer olarak *E. faecium* ve *E. faecalis* dışında daha az sıklıkla da olsa *E. casseliflavus*, *E. hiraе*, *E. durans*, *E. gallinarum* ve/veya *E. avium* türlerine de rastlandığı bildirilmiştir (Franz vd., 1999; Bakarar vd., 2000; Butaye vd., 2001; Dilik ve İstanbulluoğlu., 2010; Kasımoğlu-Doğru vd. 2010; Bayram vd., 2011; Yıldız, 2012; şahin, 2012; Klibi vd., 2013; Terkuran, 2013; Muş, 2014; Diken, 2016; Akgl vd., 2016; Onaran, 2017; Sanlibaba, 2018; Kim vd., 2018).

Tez alışması kapsamında her ne kadar genel bir *Enterococcus* izolasyonu yapılması amaçlanmamış olsa da tavuk eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* türleri arasında *E. faecium* türünün baskın tür olduğu belirlenmiştir. Tavuk eti örneklerinden izole edilen YSGD/YSSD *Enterococcus* türlerinin dağılımı izelge 4.3'de verilmiştir. Tezde elde edilen bulgulara benzer olarak tavuk eti örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da YSAD *E.*

faecium (Yoshimura vd., 2000; Harada vd., 2004; Jackson vd., 2004; Diarra vd., 2010; Padmasini vd., 2014; Sanlibaba vd., 2018), *E. faecalis* (Yoshimura vd., 2000; Harada vd., 2004; Jackson vd., 2004; Diarra vd., 2010; Yıldız, 2012; Choi ve Woo, 2013; Muş, 2014; Padmasini vd., 2014; Sanlibaba vd., 2018), *E. avium* (Padmasini vd., 2014); *E. durans* (Jackson vd., 2004; Padmasini vd., 2014), *E. gallinarum* (Harada vd., 2004; Jackson vd., 2004; Padmasini vd., 2014) ve *E. hirae* (Jackson vd., 2004; Diarra vd., 2010; Padmasini vd., 2014) türlerine rastlandığı bildirilmiştir.

Çizelge 4.3. Tavuk eti örneklerinden izole edilen YSGD*/YSSD** *Enterococcus* türlerinin dağılımı

Bakteri türü	Tavuk eti örneği (n= 112)			
	Baget (n= 16)	But (n=20)	Göğüs (n= 37)	Kanat (n= 39)
	YSGD/YSSD	YSGD/YSSD	YSGD/YSSD	YSGD/YSSD
<i>E. faecium</i> (n= 18)	-/1	-/7	-/4	-/6
<i>E. faecalis</i> (n= 5)	-/1	-/1	1/1	-/1
<i>E. durans</i> (n= 5)	-/-	-/-	4/-	1/-
<i>E. avium</i> (n= 3)	-/-	-/-	-/-	-/3
<i>E. casseliflavus</i> (n= 1)	-/-	-/-	-/-	1/-
Toplam	-/2	-/8	5/5	2/10

* YSGD: Yüksek seviyede gentamisin dirençli

** YSSD: Yüksek seviyede streptomisin dirençli

4.3. YSAD *Enterococcus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında tavuk etinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18 antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 4.4'de verilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü M100-S26 kılavuzuna göre yapılmıştır (CLSI, 2016). Disk difüzyon testi sonucu tavuk eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 4 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasından en geniş antibiyotik direnç profiline sahip izolatın *E. faecalis* MSM93.1 olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik disk difüzyon test sonuçları

Bakteriler	Antibiyotikler ¹																	
	AMP	DO	E	CN	C	LEV	LZD	QD	MH	F	NOR	P	RD	CIP	S	TEC	TE	VA
<i>E. durans</i> MGE13.1	S**	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<i>E. durans</i> MGE13.2	S	I	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<i>E. durans</i> MGE13.3	S	I	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S
<i>E. durans</i> MGE13.4	S	I	R	R	S	S	S	R	R	R	I	S	S	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSM14.1	S	R	R	R	I	R	S	I	R	I	I	S	R	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSE31.1	S	R	R	R	I	I	S	I	R	R	R	R	S	R	R	S	R	I
<i>E. faecium</i> MSE53.1	S	R	R	R	R	I	S	S	R	S	I	S	I	I	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> MSM53.1	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	I	R	R	I	R	S
<i>E. faecium</i> MSE58.1	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> MGE58.1	S	R	R	R	R	I	I	I	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> MSE61.1	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	I	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. durans</i> MGE63.1	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<i>E. avium</i> MSE63.1	S	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S
<i>E. avium</i> MSE63.2	S	I	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSM76.1	S	R	R	S	S	R	S	I	R	S	R	S	I	R	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> MSM 93.1	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. faecium</i> MSM95.1	S	R	R	S	S	R	S	I	R	S	I	S	I	R	R	S	R	I
<i>E. faecium</i> MSM103.1	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S	S	R	I	R	S	R	S

* AMP: Ampisilin (10 µg); DO: Doksisiklin (30 µg); E: Eritromisin (15 µg); CN: Gentamisin (120 µg); C: Kloramfenikol (30 µg); LEV: Levofloksasin (5 µg); LZD: Linezolid (30 µg); MH: Minosiklin (30 µg); F: Nitrofurantoin (300 µg); NOR: Norfloksasin (10 µg); P: Penisilin G (10 U); QD: Quinupristin/dalfopristin (15 µg); RD: Rifampin (5 µg); CIP: Siprofloksasin (5 µg); S: Streptomisin (300 µg); TEC: Teikoplanin (30 µg); TE: Tetrasiklin (30 µg) ve VA: Vankomisin (30 µg)

** S: Duyarlı; I: Orta seviyede duyarlı; R: Dirençli

Çizelge 4.4. YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik disk difüzyon test sonuçları (Devam)

Bakteriler	Antibiyotikler ¹																	
	AMP	DO	E	CN	C	LEV	LZD	QD	MH	F	NOR	P	RD	CIP	S	TEC	TE	VA
<i>E. faecium</i> MSM104.1	S**	R	R	S	S	S	S	S	R	S	I	S	I	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSE104.1	S	R	R	R	S	R	S	I	R	S	I	S	S	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSE104.2	S	R	R	R	S	R	S	I	R	S	R	S	I	R	R	I	R	S
<i>E. faecium</i> MSM105.1	S	R	R	S	S	S	S	R	R	S	I	S	I	R	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSM106.1	S	R	R	S	S	I	S	I	R	S	S	S	R	I	R	S	R	I
<i>E. faecium</i> MSM107.1	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S	I	S	I	R	R	S	R	I
<i>E. faecium</i> MSM108.1	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S	I	S	I	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSM109.1	S	R	R	S	S	I	S	I	R	S	I	S	R	I	R	S	R	I
<i>E. faecium</i> MSM110.1	S	R	R	S	S	I	S	I	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
<i>E. casseliflavus</i> MGM111.1	S	I	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>E. avium</i> MSE111.1	S	I	R	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSE111.2	S	I	R	S	S	R	S	R	R	S	I	S	I	I	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> MSM112.1	S	R	R	S	S	I	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> MSM112.2	S	R	R	S	S	R	S	I	R	S	I	S	R	R	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	S	I	I	S	S	S	S	R	I	S	S	S	I	I	S	S	R	I
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	S	S	R	R	R	S	I	R	I	S	S	S	R	S	R	S	S	R
<i>E. faecium</i> ATCC 51559	R	S	R	R	S	R	S	I	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R

* AMP: Ampisilin (10 µg); DO: Doksisiklin (30 µg); E: Eritromisin (15 µg); CN: Gentamisin (120 µg); C: Kloramfenikol (30 µg); LEV: Levofloksasin (5 µg); LZD: Linezolid (30 µg); MH: Minosiklin (30 µg); F: Nitrofurantoin (300 µg); NOR: Norfloksasin (10 µg); P: Penisilin G (10 U); QD: Quinupristin/dalfopristin (15 µg); RD: Rifampin (5 µg); CIP: Siprofloksasin (5 µg); S: Streptomisin (300 µg); TEC: Teikoplanin (30 µg); TE: Tetrasiklin (30 µg) ve VA: Vankomisin (30 µg)

** S: Duyarlı; I: Orta seviyede duyarlı; R: Dirençli

500 µg/mL gentamisin içeren besiyeri ortamlarından izole edilen 7 YSGD *Enterococcus* izolatının tamamının gentamisine, 2000 µg/mL streptomisin içeren besiyeri ortamlarından izole edilen 25 YSSD *Enterococcus* izolatının da tamamının streptomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Farklı kaynaklardan izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç özelliğinin araştırıldığı çalışmalar antibiyotik direnç profillerinin suşa ve izolasyon materyalinin sağlandığı bölgeye göre değiştiğini göstermektedir (Bertrand vd., 2000; Barton ve Wilksin, 2001; Huys vd., 2004; Karakaş, 2005; Mendiratta vd., 2008; Koluman vd., 2009; Karabıyık, 2011; Chajeka-Wierzchowska vd., 2012; Landeta vd., 2013; Jahan vd., 2013; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Yüksel, 2015; El-Ghazawy vd., 2016; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Sanlibaba ve Senturk, 2018; Sanlibaba vd., 2018).

Disk difüzyon testi sonucu YSAD izolatların en duyarlı olduğu antibiyotiklerin ampisilin (% 93.75), linezolid (% 93.75), penisilin G (% 90.62), teikoplanin (% 90.62), nitrofurantoin (% 78.12), vankomisin (% 75) ve kloramfenikol (% 68.75) olduğu tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinin eritromisine duyarlı olmadığı belirlenmiştir. İzolatlar denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere ise farklı oranda duyarlılık göstermişlerdir. YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Tezde elde edilen bulgulara benzer olarak El-Ghazawy vd. (2016), YSAD klinik *Enterococcus* izolatlarının linezolid (% 97.9), teikoplanin (% 93.7) ve vankomisine (% 93.7) yüksek oranda duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Tez kapsamında YSAD *Enterococcus* izolatlarının en dirençli olduğu antibiyotiklerin eritromisin (% 96.87), minosiklin (% 96.87), streptomisin (% 96.87) ve tetrasiklin (% 96.87) olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu bulgulara benzer olarak Mendiratta vd. (2008), de YSAD *Enterococcus* izolatlarında yüksek oranda eritromisin ve tetrasiklin direnci tespit etmişlerdir. Bu bulgulara ilaveten izolatların siprofloksasin, kloramfenikol ve rifampisin direnç oranları da tezde elde edilen bulgulara benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan, araştırmacılar tezde elde edilen bulguların aksine izolatların ampisiline ve penisiline yüksek oranda direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. YSAD klinik *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı bir başka

çalışmada da tezde elde edilen bulguya benzer olarak yüksek oranda eritromisin direnci tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada da ampisilin (% 40.4'ü dirençli) ve penisilin (% 46.8'i dirençli) direnç oranları tezde elde edilen oranlardan yüksek bulunmuştur (El-Ghazawy vd., 2016).

Çizelge 4.5. YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri (%)

Antibiyotikler	S*		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Ampisilin	30	93.75	0	0	2	6.25
Doksisiklin	1	3.13	8	25	23	71.87
Eritromisin	0	0	1	3.13	31	96.87
Gentamisin	14	43.75	0	0	18	56.25
Kloramfenikol	22	68.75	3	9.37	7	21.88
Levofloksasin	14	43.75	7	21.87	11	34.38
Linezolid	30	93.75	1	3.13	1	3.12
Minosiklin	1	3.13	0	0	31	96.87
Nitrofurantoin	25	78.12	1	3.13	6	18.75
Norfloksasin	9	28.13	13	40.62	10	31.25
Penisilin G	29	90.63	0	0	3	9.37
Quinupristin/dalfopristin	5	15.63	15	46.87	12	37.50
Rifampin	15	46.87	10	31.25	7	21.88
Siprofloksasin	5	15.63	13	40.62	14	43.75
Streptomisin	1	3.13	0	0	31	96.87
Teikoplanin	29	90.62	2	6.25	1	3.13
Tetrasiklin	1	3.13	0	0	31	96.87
Vankomisin	24	75	7	21.87	1	3.13

* S: Duyarlı; I: Orta seviyede dirençli; R: Dirençli

Tavuk eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* türlerinin antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri Çizelge 4.6' da verilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* türü üyesi izolatların antibiyotik direnç profillerinin diğer izolatlara nazaran daha geniş olduğu tespit edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarının linezolid hariç, *E. faecium* izolatlarının ise linezolid, teikoplanin ve vankomisin hariç denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere direnç gösteren izolatlarının olduğu belirlenmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda *Enterococcus* türlerinin antibiyotik dirençlerinin izolasyon kaynağına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalar *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin diğer türlere nazaran daha geniş antibiyotik direncine sahip olduğunu göstermiştir (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2012; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Russo vd., 2018).

Çizelge 4.6. YSAD *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium* ve *E. casseliflavus* suşlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri (%)

Antibiyotikler	<i>E. faecium</i> (n: 18)			<i>E. faecalis</i> (n: 5)			<i>E. durans</i> (n: 5)			<i>E. avium</i> (n: 3)			<i>E. casseliflavus</i> (n: 1)		
	S*	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ampisilin	94.44	0	5.56	80	0	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Doksisisiklin	0	5.56	94.44	0	0	100	20	60	20	0	100	0	0	100	0
Eritromisin	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	33.33	66.67	0	0	100
Kloramfenikol	11.11	11.11	77.78	40	0	60	80	0	20	33.33	0	66.67	0	0	100
Gentamisin	55.56	0	44.44	20	0	80	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Levofloksasin	27.78	27.78	44.44	20	40	40	100	0	0	66.67	0	33.33	100	0	0
Linezolid	100	0	0	60	20	20	100	0	0	0	0	100	100	0	0
Minosiklin	0	0	100	0	0	100	20	0	80	0	0	100	0	0	100
Nitrofurantoin	88.88	5.56	5.56	100	0	0	20	0	80	66.67	0	33.33	100	0	0
Norfloksasin	11.11	61.11	27.78	0	20	80	80	20	0	66.67	0	33.33	100	0	0
Penisilin G	94.44	0	5.56	60	0	40	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Quinupristin/dalfopristin	16.67	72.12	11.11	0	20	80	0	0	100	33.33	33.33	33.34	100	0	0
Rifampin	16.67	50	33.33	60	20	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Siprofloksasin	0	50	50	20	0	100	20	80	0	66.67	0	33.33	100	0	0
Streptomisin	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	0	0
Teikoplanin	94.44	5.56	0	60	20	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Tetrasiklin	0	0	100	0	0	100	20	0	80	0	0	100	0	0	100
Vankomisin	61.11	38.89	0	80	0	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0

* S:Duyarlı, I:Orta seviyede duyarlı, R:Dirençli

Tez çalışması kapsamında tavuk eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* izolatlarının 4 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe dirençli oldukları tespit edilmiştir. İzolatların tamamının (% 100) çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu tespit edilmiştir. Geçmiş yıllarda tavuk/tavuk eti örneklerinden izole edilen enterokokların antibiyotik direncinin araştırıldığı çalışmalarda da enterokok izolatlarının çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Diarra vd., 2010; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Kim vd., 2018; Sanlibaba vd., 2018). Diarra vd. (2010), broiler tavuk örneklerinden izole ettikleri 69 *Enterococcus* izolatının 65'inin (% 94.2) beş ve daha fazla sayıda antibiyotiğe dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada Dilik ve İstanbulluoğlu (2010), 229 broiler örneğinden izole ettiği enterokok suşlarının % 34.50'sinin 3 ile 6 arasında değişen sayıda antibiyotiğe çoklu direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kore'de yapılan bir çalışmada da geleneksel ve organik yetiştirilen tavuk karkaslarından izole ettikleri 104 *Enterococcus* izolatının 47'sinin (% 45.1) çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlenmiştir (Kim vd., 2018). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada Sanlibaba vd. (2018), Ankara'dan temin ettikleri 122 tavuk eti örneğinden izole ettikleri 97 enterokok izolatının % 97.93'ünün çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini bildirmişlerdir.

E. faecalis ve *E. faecium* türleri önemli nozokomiyal patojenlerdir. Bu türler nozokomiyal enfeksiyonların en yaygın nedenleri arasında gösterilmektedir (Oravcova, 2013). Enterokokların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç bu bakterilerin patojenitesine katkıda bulunan faktörlerin başında gelmektedir (Yoğurtcu ve Tuncer, 2013). Antibiyotik direncin yaygınlaşması global düzeyde endişe uyandırmaktadır. Kommensal ve patojen bakterilerde antibiyotik direncin artışıdaki temel unsurlardan biri hayvan yetiştiriciliğinde bilinçsiz ve kontrolsüz olarak klinik öneme sahip antibiyotiklerin kullanılmasıdır (Garrido vd., 2014). Tez çalışması kapsamında tavuk eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* izolatlarının tamamının çoklu antibiyotik direnç özelliği göstermesi enterokokların antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında rezervuar görevi görebilmesi nedeniyle endişe uyandırıcıdır.

4.4. YSAD *Enterococcus* İzolatlarının Gentamisin ve Streptomisin Antibiyotiklerine Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK)

Enterokoklar son yıllarda ciddi nozokomiyal enfeksiyonların bir nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. Bu tür enfeksiyonların tedavi edilmesinde, genellikle bir penisilin veya bir glikopeptid ya da yaygın olarak gentamisin veya streptomisin aminoglikozidleri ile sinerjistik bir kombinasyonu tercih edilmektedir. Bu kombinasyonların etkinliği, penisiline direnç, yüksek seviyelerde aminoglikozidler ve glikopeptidler dahil olmak üzere, çoklu antibiyotik direncini gösteren enterokok suşlarının ortaya çıkmasıyla tehlikeye girmiştir (Murray, 1990). Yüksek seviyede aminoglikozid direnci varlığında, bu kombinasyonun etkili olabilmesi için yeterli sinerjistik etki sağlanamamakta ve vankomisin ilk tercih edilen antibiyotik olmaktadır (Koneman vd., 1997). Bu nedenle enterokoklarda antibiyotik direncinin, özellikle glikopeptid direncinin doğru saptanması kritik önem taşımaktadır. “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” enterokoklarda mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Bunun yanında sonuçların tekrarlanabilirliği, tür düzeyinde tanımlamanın yapılabilmesi, aynı anda antibiyotik duyarlılık değerlerinin verilmesi, kısa sürede sonuçların rapor edilebilmesi, epidemiyolojik verilerin daha kolay ulaşılabilmesi ve maliyetin azaltılması gibi avantajlar, otomatize tanımlama ve duyarlılık saptama yöntemlerinin tercih edilmesine neden olmaktadır (Brigante vd., 2007).

Tez kapsamında elde edilen YSAD enterokok izolatların gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı gösterdikleri minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) 96-kuyucuklu mikrotiter plakalar kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre test edilmiştir. Denemelerde *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 51559 ve *E. faecalis* ATCC 51299 suşları kontrol olarak kullanılmıştır. YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı gösterdikleri MİK değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. İzolatların gentamisin MİK değerlerinin 16 ile >4096 µg/mL ve streptomisin MİK değerlerinin ise 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. MİK testi sonucu YSSD izolatlarının tamamı streptomisine, YSGD izolatlarının

tamamı ise gentamisine dirençli bulunmuştur. Aynı zamanda YSSD izolatlarının % 56'sının gentamisine ve YSGD izolatlarının ise % 85.71'inin streptomisine karşı yüksek seviyede dirence sahip olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında tavuk eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'inin (% 56.25) hem YSSD hem de YSGD oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı MİK değerleri

Bakteri	Gentamisin MİK (µg/mL)	Streptomisin MİK (µg/mL)	Toplam direnç
<i>E. durans</i> MGE13.1	>4096 ^R	4096 ^R	2
<i>E. durans</i> MGE13.2	4096 ^R	4096 ^R	2
<i>E. durans</i> MGE13.3	>4096 ^R	2048 ^R	2
<i>E. durans</i> MGE13.4	>4096 ^R	2048 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSM14.1	4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSE31.1	1024 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSE53.1	4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecalis</i> MSM53.1	4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSE58.1	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecalis</i> MGE58.1	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecalis</i> MSE61.1	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. durans</i> MGE63.1	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. avium</i> MSE63.1	4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. avium</i> MSE63.2	2048 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSM76.1	32	>4096 ^R	1
<i>E. faecalis</i> MSM 93.1	128	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM95.1	32	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM103.1	64	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM104.1	64	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSE104.1	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSE104.2	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSM105.1	64	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM106.1	64	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM107.1	32	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM108.1	32	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM109.1	32	>4096 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM110.1	32	>4096 ^R	1
<i>E. casseliflavus</i> MGM111.1	4096 ^R	64	1
<i>E. avium</i> MSE111.1	512 ^R	4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> MSE111.2	256 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecalis</i> MSM112.1	16	2048 ^R	1
<i>E. faecium</i> MSM112.2	64	>4096 ^R	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	128	256	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	>4096 ^R	>4096 ^R	2
<i>E. faecium</i> ATCC 51559	>4096 ^R	>4096 ^R	2

^R Dirençli. EUCAST (2018)'e göre gentamisin ve streptomisin MİK sınır değerleri sırasıyla >128 ve >512 µg/mL alınmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile Dünya genelinde farklı kaynaklardan YSGD (MİK ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$) ve/veya YSSD (MİK ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$) *Enterococcus* cinsi üyesi türlerin izole edildiği rapor edilmiştir (Donabedian vd., 2002; Jackson vd., 2004; Harada vd., 2004; Petsaris vd., 2005; Chan vd., 2008; Diarra vd., 2010; Han vd., 2011; Choi ve Woo, 2013; Lan vd., 2016; Niu vd., 2016). Donabedian vd. (2002), insan dışkı örneklerinden, sağlıklı çiftlik hayvanlarından (tavuk, inek, domuz, hindi) ve gıdalardan (tavuk eti, domuz eti) izole ettikleri enterokokların, 360'ında gentamisin MİK değerini >128 $\mu\text{g/mL}$, 258'inde >2000 $\mu\text{g/mL}$ ve 102'sinde $128-1024$ $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit etmişlerdir. Jackson vd. (2004), kümes hayvanları karkaslarından izole ettikleri enterokoklardan, 67 izolatın kanamisine (MİK > 500 $\mu\text{g/mL}$), 37 izolatın (% 23) gentamisine (MİK > 500 $\mu\text{g/mL}$), 31 izolatın streptomisine (% 19) (MİK > 1000 $\mu\text{g/mL}$) dirençli olduğunu saptamışlardır. Harada vd. (2004), tavuk örneklerinden izole ettikleri 19 suşun gentamisin MİK değerlerinin $256-2048$ $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu belirtmişlerdir. Yine Petsaris vd. (2005), tavuk örneklerinden izole ettikleri 90 *E. faecium* izolatından 3'ünün yüksek gentamisin direncine sahip olduğunu (MİK > 512 $\mu\text{g/mL}$) bulmuşlardır. Chan vd. (2008), kanatlı çiftliklerinden ve çevredeki ortamdan toplam 225 vankomisin dirençli enterokok (VRE) ve aminoglikozid dirençli enterokoklar tespit etmişlerdir. 44 izolatta, yüksek seviyeli gentamisin direnci (MİK = $100-500$ $\mu\text{g/mL}$) tespit etmişlerdir. Benzer olarak Diarra vd. (2010), tavuk örneklerinden izole ettikleri 69 enterokok izolatının MİK değerlerinin gentamisin için $128-512$ $\mu\text{g/mL}$, streptomisin için ise $512-2048$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Han vd. (2011), Güney Kore'de yapılan bir çalışmada, 27 *E. faecalis* izolatından 11'inin gentamisine, 8'inin streptomisine (MİK > 1000 $\mu\text{g/mL}$), 29 *E. faecium* izolatından 4'ünün gentamisine, 6'sının ise streptomisine (MİK > 1000 $\mu\text{g/mL}$), 2 *E. hirae* izolatının her ikisinin de streptomisine dirençli (MİK > 1000 $\mu\text{g/mL}$) olduğunu tespit etmişlerdir. Choi ve Woo (2013), Kore'de yaptıkları çalışmada 2003 ve 2010 yılları arasında toplanan 101 perakende tavuk etinden *E. faecalis* izole etmişler ve izolatların 11'inin gentamisine yüksek seviyede direnç (MİK > 2048 $\mu\text{g/mL}$) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Lan vd. (2016), Tibet domuzu dışkı örneğinden izole ettikleri enterokok izolatlarının % 76.5'inin gentamisin MİK değerinin ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$ ve % 68.6'sının streptomisin MİK değerinin ≥ 2048 $\mu\text{g/mL}$

olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca izolatların % 39.2'sinin hem YSGD hem de YSSD olduğunu rapor etmişlerdir.

4.5. YSAD *Enterococcus* İzolatlarında Aminoglikozid-modifiye Edici Enzim (AME) Genlerinin PZR ile Araştırılması

Tez çalışması kapsamında tavuk etinden izole edilen YSAD *Enterococcus* izolatlarında yüksek seviyede streptomisin (*ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia* ve *aph(3')-IIIa*) ve gentamisin (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id*) direnci ile ilişkili aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) genlerinin varlığı spesifik primerler kullanılarak Vakulenko vd. (2003) ve Niu vd. (2016) tarafından önerilen PZR protokolleri kullanılarak araştırılmıştır. PZR denemeleri ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir. PZR denemeleri sonucu YSAD *Enterococcus* izolatlarının 1 ile 5 arasında değişen sayıda AME geni içerdiği tespit edilmiştir. İzolatların % 87.5'inde (28/32) *ant(6')-Ia* (Şekil 4.5 ve 4.6), % 78.13'ünde (25/32) *aph(3')-IIIa*, % 68.75'inde (22/32) *ant(4')-Ia*, % 62.5'inde (20/32) *aph(2'')-Ib*, % 21.88'inde (7/32) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve % 9.38'inde (3/32) *aph(2'')-Ic* geni varlığı tespit edilmiştir. YSAD enterokoklarda AME genlerinin varlığının araştırıldığı geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda tezde elde edilen bulguların aksine en sık rastlanan AME geninin iki fonksiyonlu *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni olduğu bildirilmiştir (Jaimee ve Halami, 2016; Li vd., 2016; Niu vd., 2016; Ramin vd., 2017; Shete vd., 2017; Amini vd., 2018). Streptomisin dışındaki bütün aminoglikozidlere karşı direnç *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni tarafından kodlanan iki fonksiyonlu bir AME olan AAC(6')-APH(2'') aracılığı ile gerçekleşmektedir. *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni yüksek seviyede gentamisin ve kanamisin direnci ile ilişkilidir. Tek fonksiyonlu AME kodlayan *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri yüksek seviyede gentamisin, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genleri ise gentamisin dışındaki çeşitli aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur (Vakulenko vd., 2003; Jaimee ve Halami, 2016; Niu vd., 2016; Pourcel vd., 2017).

Çizelge 4.8. YSAD *Enterococcus* suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili

Bakteriler	Aminoglikozid-modifiye edici enzim genleri							Aminoglikozid direnç profili***
	<i>aph(3')-IIIa</i> *	<i>ant(4')-Ia</i> *	<i>ant(6')-Ia</i> *	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> **	<i>aph(2'')-Ib</i> **	<i>aph(2'')-Ic</i> **	<i>aph(2'')-Id</i> **	
<i>E. durans</i> MGE13.1	-	-	+	+	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> MGE13.2	-	+	+	+	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> MGE13.3	-	-	+	+	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> MGE13.4	-	-	+	+	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSM14.1	+	+	-	+	+	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSE31.1	+	-	+	-	+	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSE53.1	+	+	+	-	+	+	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> MSM53.1	+	-	+	-	+	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSE58.1	+	-	-	+	+	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> MGE58.1	+	+	+	-	+	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> MSE61.1	+	+	+	-	+	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> MGE63.1	-	+	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. avium</i> MSE63.1	-	+	+	+	-	+	-	CN, S
<i>E. avium</i> MSE63.2	+	+	-	-	+	+	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSM76.1	+	+	+	-	-	-	-	S
<i>E. faecalis</i> MSM 93.1	+	-	+	-	-	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM95.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM103.1	+	+	+	-	-	-	-	S

* Yüksek seviyede streptomisin direnci ile ilişkili genler

** Yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili genler

*** MİK sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (CN: gentamisin, S: streptomisin)

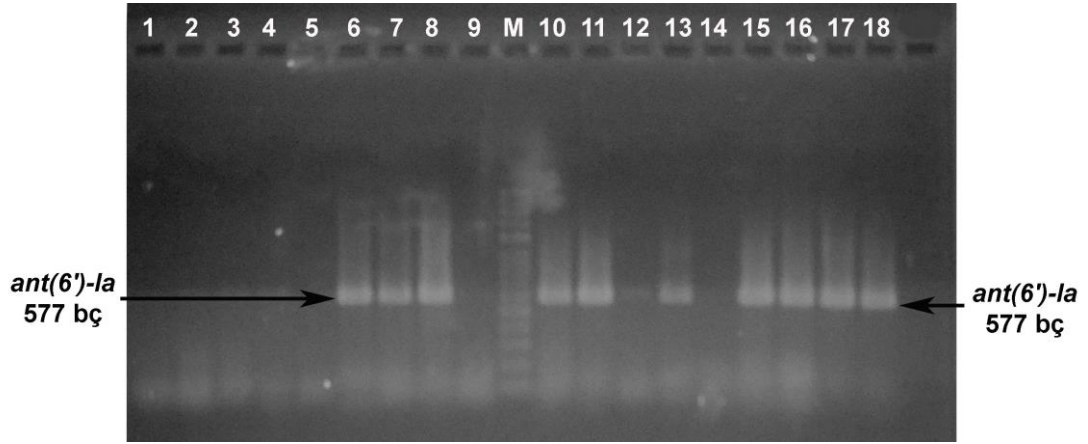
Çizelge 4.8. YSAD *Enterococcus* suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili (Devam)

Bakteriler	Aminoglikozid-modifiye edici enzim genleri							Aminoglikozid direnç profili***
	<i>aph(3')-IIIa*</i>	<i>ant(4')-Ia*</i>	<i>ant(6')-Ia*</i>	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia**</i>	<i>aph(2'')-Ib**</i>	<i>aph(2'')-Ic**</i>	<i>aph(2'')-Id**</i>	
<i>E. faecium</i> MSM104.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSE104.1	+	-	+	-	+	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSE104.2	+	+	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSM105.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM106.1	+	-	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM107.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM108.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM109.1	+	+	+	-	-	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM110.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. casseliflavus</i> MGM111.1	-	+	+	-	+	-	-	CN
<i>E. avium</i> MSE111.1	+	-	+	-	+	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> MSE111.2	+	+	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> MSM112.1	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecium</i> MSM112.2	+	+	+	-	+	-	-	S
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	+	-	-	+	+	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> ATCC 51559	-	+	+	-	-	-	-	CN, S

* Yüksek seviyede streptomisin direnci ile ilişkili genler

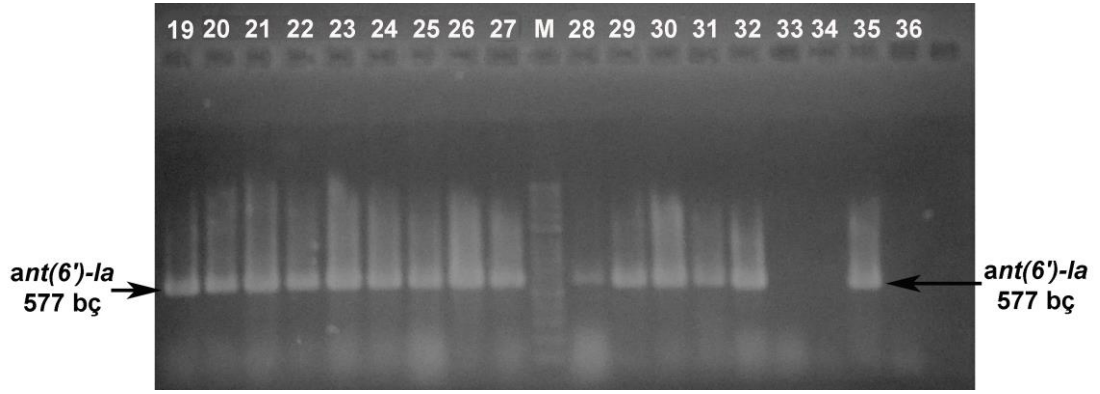
** Yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili genler

*** MİK sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (CN: gentamisin, S: streptomisin)



Şekil 4.5. *ant(6')-Ia* genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü

1	<i>E. durans</i> MGE13.1	: -
2	<i>E. durans</i> MGE13.2	: -
3	<i>E. durans</i> MGE13.3	: -
4	<i>E. durans</i> MGE13.4	: -
5	<i>E. faecium</i> MSM14.1	: -
6	<i>E. faecium</i> MSE31.1	: 577 bç
7	<i>E. faecium</i> MSE53.1	: 577 bç
8	<i>E. faecalis</i> MSM53.1	: 577 bç
9	<i>E. faecium</i> MSE58.1	: -
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
10	<i>E. faecalis</i> MGE58.1	: 577 bç
11	<i>E. faecalis</i> MSE61.1	: 577 bç
12	<i>E. durans</i> MGE63.1	: -
13	<i>E. avium</i> MSE63.1	: 577 bç
14	<i>E. avium</i> MSE63.2	: -
15	<i>E. faecium</i> MSM76.1	: 577 bç
16	<i>E. faecalis</i> MSM 93.1	: 577 bç
17	<i>E. faecium</i> MSM95.1	: 577 bç
18	<i>E. faecium</i> MSM103.1	: 577 bç



Şekil 4.6. *ant(6')-Ia* genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü

19	<i>E. faecium</i> MSM104.1	: 577 bç
20	<i>E. faecium</i> MSE104.1	: 577 bç
21	<i>E. faecium</i> MSE104.2	: 577 bç
22	<i>E. faecium</i> MSM105.1	: 577 bç
23	<i>E. faecium</i> MSM106.1	: 577 bç
24	<i>E. faecium</i> MSM107.1	: 577 bç
25	<i>E. faecium</i> MSM108.1	: 577 bç
26	<i>E. faecium</i> MSM109.1	: 577 bç
27	<i>E. faecium</i> MSM110.1	: 577 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
28	<i>E. casseliflavus</i> MGM111.1	: 523 bç
29	<i>E. avium</i> MSE111.1	: 523 bç
30	<i>E. faecium</i> MSE111.2	: 523 bç
31	<i>E. faecalis</i> MSM112.1	: 523 bç
32	<i>E. faecium</i> MSM112.2	: 523 bç
33	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	: -
34	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	: -
35	<i>E. faecium</i> ATCC 51559	: 523 bç
36	Su (negatif kontrol)	: -

Tez çalışması kapsamında YSAD *Enterococcus* izolatlarının hiçbirinde *aph(2'')-Id* geni varlığı gözlenmemiştir. Tezde elde edilen bu bulguya benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da YSAD *Enterococcus* izolatlarında *aph(2'')-Id* geni varlığı tespit edilmemiştir (Choi ve Woo, 2010; Padmasini vd., 2014; Shete vd., 2017; Amini vd., 2018). Diğer taraftan Donabedian vd. (2003), Harada vd. (2004), Jackson vd. (2004), Chajęcka-Wierzchowska vd. (2016) ve Nowakiewicz vd. (2017) farklı kaynaklardan izole edilen *Enterococcus* türlerinde düşük oranda da olsa *aph(2'')-Id* geni varlığını rapor etmişlerdir.

500 µg/mL gentamisin içeren besiyerlerinden izole edilen 7 YSGD *Enterococcus* izolatının 6'sında (% 85.71) *ant(6')-Ia*, 4'ünde (% 57.14) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, 4'ünde (% 57.14) *ant(4')-Ia* ve 2'sinde *aph(2'')-Ib* geni varlığı tespit edilmiştir. İzolatlarında en sık karşılaşılan genotipin % 42.86 ile *ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* ve/veya *aph(3')-IIIa* genlerinin yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Feizabadi vd., 2006; Choi ve Woo, 2013; Khani vd., 2016; Niu vd., 2016). Feizabadi vd. (2006), Khani vd. (2016) ve Niu vd. (2016) klinik YSGD enterokok izolatlarında *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve *aph(3')-IIIa* genlerinin sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir. Choi ve Woo (2013), tavuk etinden izole ettikleri YSGD *Enterococcus* suşlarının tamamının *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Niu vd. (2016), klinik YSGD enterokok izolatlarında en sık karşılaşılan AME genlerinin % 85.3 ile *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, % 25 ile *aph(3')-IIIa*, % 21.4 ile *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(3')-IIIa* genleri olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, YSGD izolatlarının *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genlerini de içerdiğini saptamışlardır.

Çizelge 4.9. YSGD *Enterococcus* izolatlarının AME genotip yüzdeleri (%)

AME genleri	YSGD (n= 7)
	n (%)
<i>ant(4')-Ia</i>	1 (% 14.29)
<i>ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	3 (% 42.86)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	1 (% 14.29)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	1 (% 14.29)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	1 (% 14.29)

2000 µg/mL streptomisin içeren besiyerlerinden izole edilen 25 YSSD izolatının 24'ünde (% 96) *aph(3')-IIIa*, 22'sinde (% 88) *ant(6')-Ia*, 18'inde (% 72) *ant(4')-Ia*, 18'inde (% 72) *aph(2'')-Ib*, 3'ünde (% 12) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve 3'ünde (% 12) *aph(2'')-Ic* geni varlığı tespit edilmiştir. YSSD izolatlarında en sık karşılaşılan (% 40) genotipin *aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib* olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Tezde elde edilen bu bulgulara benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da yüksek seviyede streptomisin dirençli enterokok izolatlarında sıklıkla *aph(3')-IIIa* (Padmasini

vd., 2014; Niu vd., 2016; Shete vd., 2017) ve *ant(6')-Ia* (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2016; Niu vd., 2016; Tyson vd., 2018) genlerinin tespit edildiği bildirilmiştir. Padmasini vd. (2014), 53 YSSD klinik enterokok izolatının % 77.4'ünde *aph(3')-IIIa* genini tespit etmişlerdir. Chajęcka-Wierzchowska vd. (2016), tüketime hazır et örneklerinden izole edilen enterokok suşları içerisinde streptomisin dirençli izolatlarda sıklıkla *ant(6')-Ia* geni varlığını rapor etmişlerdir. Niu vd. (2016), YSSD klinik enterokok izolatlarında *aph(3')-IIIa* ve *ant(6')-Ia* genlerinin yüksek sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar 14 YSSD enterokok izolatının % 71.4'ünde *ant(6')-Ia*, % 57.1'inde *aph(3')-IIIa* ve % 50'sinde her ikisinin birlikte bulunduğunu tespit etmişlerdir. Shete vd. (2017), YSSD klinik enterokok izolatlarının % 40'ında *aph(3')-IIIa* geni varlığını saptamışlardır. Benzer olarak Tyson vd. (2018), streptomisin dirençli suşların % 52'sinde *ant(6')-Ia* geni varlığını belirlemişlerdir.

Çizelge 4.10. YSSD *Enterococcus* izolatlarının AME genotip yüzdeleri (%)

AME genleri	YSSD (n= 25)
	n (%)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia</i>	1 (% 4)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia</i>	5 (% 20)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	5 (% 20)
<i>aph(3')-IIIa + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	1 (% 4)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	1 (% 4)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aph(2'')-Ib + aph(2'')-Ic</i>	1 (% 4)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(2'')-Ic</i>	1 (% 4)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	10 (% 40)

YSAD, YSGD ve YSSD *Enterococcus* türlerinin AME geni profilleri ve dağılımları sırasıyla Çizelge 4.11, 4.12 ve 4.13'de verilmiştir. YSAD *E. faecium* ve *E. faecium* izolatlarında en sık rastlanan AME genlerinin *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* olduğu saptanmıştır. Söz konusu türlerde en sık rastlanan AME profilinin ise *aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib* olduğu tespit edilmiştir. *E. faecium* izolatlarının % 44.44'ünde ve *E. faecalis* izolatlarının % 60'ında bu profilin varlığı belirlenmiştir. *E. durans* izolatlarında *ant(6')-Ia* ve *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*'nın en yaygın genler olduğu ve izolatların % 60'ında bu genlerin birlikte bulunduğu saptanmıştır. *E. avium* ve *E. casseliflavus* izolatlarında ise farklı AME profillerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. YSAD *Enterococcus* türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları

AME genleri	<i>E. faecium</i> (n= 18)	<i>E. faecalis</i> (n= 5)	<i>E. durans</i> (n= 5)	<i>E. avium</i> (n= 3)	<i>E.casseliflavus</i> (n=1)	Toplam (n= 32)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>ant(4')-Ia</i>			1 (% 20)			1 (% 3.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia</i>		1 (% 20)				1 (% 3.13)
<i>ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>			3 (% 60)			3 (% 9.38)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>			1 (% 20)			1 (% 3.13)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>					1 (% 100)	1 (% 3.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia</i>	5 (% 27.78)					5 (% 15.63)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	3 (% 16.67)	1 (% 20)		1 (% 33.33)		5 (% 15.63)
<i>aph(3')-IIIa + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	1 (% 5.56)					1 (% 3.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	8 (% 44.44)	3 (% 60)				11 (% 34.38)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(2'')-Ib</i>	1 (% 5.56)					1 (% 3.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aph(2'')-Ib + aph(2'')-Ic</i>				1 (% 33.33)		1 (% 3.13)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia + aph(2'')-Ic</i>				1 (% 33.33)		1 (% 3.13)

Çizelge 4.12. YSGD *Enterococcus* türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları

AME genleri	<i>E. durans</i> (n= 5)	<i>E. faecalis</i> (n= 1)	<i>E.casseliflavus</i> (n=1)	Toplam (n= 7)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>ant(4')-Ia</i>	1 (% 20)			1 (% 14.29)
<i>ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	3 (% 60)			3 (% 42.86)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	1 (% 20)			1 (% 14.29)
<i>ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>			1 (% 100)	1 (% 14.29)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib</i>		1 (% 100)		1 (% 14.29)

Çizelge 4.13. YSSD *Enterococcus* türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları

AME genleri	<i>E. faecium</i> (n= 18) n (%)	<i>E. faecalis</i> (n= 4) n (%)	<i>E. avium</i> (n= 3) n (%)	Toplam (n= 25) n (%)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>ant</i> (6')-Ia		1 (% 25)		1 (% 4)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>ant</i> (4')-Ia + <i>ant</i> (6')-Ia	5 (% 27.78)			5 (% 20)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>ant</i> (6')-Ia + <i>aph</i> (2'')-Ib	3 (% 16.67)	1 (% 25)	1 (% 33.33)	5 (% 20)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia + <i>aph</i> (2'')-Ib	1 (% 5.56)			1 (% 4)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>ant</i> (4')-Ia + <i>ant</i> (6')-Ia + <i>aph</i> (2'')-Ib	8 (% 44.44)	2 (% 50)		10 (% 40)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>ant</i> (4')-Ia + <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia + <i>aph</i> (2'')-Ib	1 (% 5.56)			1 (% 4)
<i>aph</i> (3')-IIIa + <i>ant</i> (4')-Ia + <i>aph</i> (2'')-Ib + <i>aph</i> (2'')-Ic			1 (% 33.33)	1 (% 4)
<i>ant</i> (4')-Ia + <i>ant</i> (6')-Ia + <i>aac</i> (6')-Ie- <i>aph</i> (2'')-Ia + <i>aph</i> (2'')-Ic			1 (% 33.33)	1 (% 4)

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda tezde elde edilen bulguların aksine gentamisin dirençli *Enterococcus* türlerinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni bulunma sıklığı daha yüksek bulunmuştur. Ancak diğer taraftan tezde elde edilen bulgulara benzer olarak streptomisin dirençli türlerde *aph(3')-IIIa* ve *ant(6')-Ia* geni bulunma sıklığı yüksek bulunmuştur (Padmasini vd., 2014; Niu vd., 2016; Shete vd., 2017). Padmasini vd. (2014), yüksek seviyede gentamisin dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının tamamında *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni varlığını tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra *E. faecalis* izolatlarının % 39.5'inin *E. faecium* izolatlarının ise % 37.5'inin *aph(3')-IIIa* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Niu vd. (2016), YSGD enterokok izolatlarının tamamının *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni içerdiğini ve YSSD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının ise % 71.4'ünün *ant(6')-Ia*, % 57.1'inin *aph(3')-IIIa* ve % 50'sinin *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* AME geni profiline sahip olduklarını bildirmişlerdir. Shete vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada da YSGD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni içerirken, YSSD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının *aph(3')-IIIa* geni içerdiğini bildirmişlerdir.

Disk difüzyon ve MİK testleri sonucu yüksek seviyede gentamisin ve streptomisin dirençli olduğu tespit edilen 500 µg/mL gentamisin içeren besiyerlerinden izole edilen *E. durans* MGE13.1, MGE13.2, MGE13.3, MGE13.4 ve *E. faecalis* MGE58.1 suşlarının genomik DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı PZR denemeleri sonucu fenotipik test sonuçları ve PZR sonuçları arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Diğer taraftan fenotipik olarak yüksek seviyede gentamisin ve streptomisin dirençli *E. durans* MGE63.1 izolatında sadece streptomisin dışında çeşitli aminoglikozidlere karşı dirençten sorumlu *ant(4')-Ia* geni varlığı gösterilmiştir. Benzer olarak fenotipik olarak yüksek seviyede gentamisin dirençli *E. casseliflavus* MGM111.1 izolatında ise *aph(2'')-Ib* geni yanı sıra *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genleri bulunmasına rağmen fenotipik olarak streptomisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Disk difüzyon ve MİK testleri sonucu 2000 µg/mL streptomisin içeren besiyerlerinden izole edilen yüksek seviyede gentamisin ve streptomisin dirençli olduğu tespit edilen *E. faecium* MSM14.1, MSE31.1, MSE53.1, MSE58.1, MSE104.1, *E. faecalis* MSM53.1, MSE61.1 ve *E. avium* MSE63.1 ve MSE63.2 suşlarının AME genlerinin araştırıldığı PZR

sonuçları ve fenotipik test sonuçları arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Fenotipik olarak yüksek seviyede streptomisin direnci gösteren *Enterococcus* suşlarının tamamının PZR ve fenotipik test sonuçlarının uyum gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan fenotipik olarak yüksek seviyede gentamisin ve streptomisin dirençli olduğu tespit edilen *E. faecium* MSE104.1 ve MSE111.2 suşlarında streptomisin direnci ile ilişkili *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genlerinin varlığı tespit edilirken gentamisin direnci ile ilişkili bir gen tespit edilmemiştir. Fenotipik ve genotipik testler arasında korelasyon görülmeyen suşlarda (*E. durans* MGE63.1, *E. casseliflavus* MGM111.1, *E. faecium* MSE104.1 ve MSE111.2) yüksek seviyede aminoglikozid direncinden tez kapsamında araştırılan AME genleri dışında farklı bir direnç mekanizmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da AME geni tespit edilemeyen izolatlarda fenotip olarak yüksek seviyede aminoglikozid direnci saptanmıştır (Jackson vd., 2004; Choi ve Woo, 2013; Padmasini vd., 2014; Niu vd., 2016).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında Antalya ve Isparta illerinden toplanan 112 tavuk eti örneğinden 32 yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) *Enterococcus* suşu izole edilmiştir. İzolatlar türe özgü PZR ve 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. YSAD izolatlar arasında baskın türün *E. faecium* olduğu belirlenmiştir. İzolatların 18'i *E. faecium* (% 56.25), 5'i *E. faecalis* (% 15.63), 5'i *E. durans* (% 15.63), 3'ü *E. avium* (% 9.37) ve 1'i *E. casseliflavus* (% 3.12) olarak tanımlanmıştır.

Disk difüzyon testi sonucu tavuk eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 4 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasından en geniş antibiyotik direnç profiline sahip izolatın *E. faecalis* MSM93.1 olduğu tespit edilmiştir. YSAD izolatların en duyarlı olduğu antibiyotiklerin ampisilin (% 93.75), linezolid (% 93.75), penisilin G (% 90.62), teikoplanin (% 90.62), nitrofurantoin (% 78.12), vankomisin (% 75) ve kloramfenikol (% 68.75) olduğu tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinin eritromisine duyarlı olmadığı belirlenmiştir. İzolatlar denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere ise farklı oranda duyarlılık göstermişlerdir. Tez kapsamında YSAD *Enterococcus* izolatlarının en dirençli olduğu antibiyotiklerin eritromisin (% 96.87), minosiklin (% 96.87), streptomisin (% 96.87) ve tetrasiklin (% 96.87) olduğu belirlenmiştir. İzolatların tamamının (% 100) çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu tespit edilmiştir.

İzolatların gentamisin MİK değerlerinin 16 ile >4096 µg/mL ve streptomisin MİK değerlerinin ise 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. MİK testi sonucu YSSD izolatlarının tamamı streptomisine, YSGD izolatlarının tamamı ise gentamisine dirençli bulunmuştur. Aynı zamanda YSSD izolatlarının % 56'sının gentamisine ve YSGD izolatlarının ise % 85.71'inin streptomisine karşı yüksek seviyede dirence sahip olduğu belirlenmiştir.

PZR denemeleri sonucu YSAD *Enterococcus* izolatlarının 1 ile 5 arasında değişen sayıda AME geni içerdiği tespit edilmiştir. İzolatların % 87.5'inde (28/32) *ant(6')-Ia* (Şekil 4.5 ve 4.6), % 78.13'ünde (25/32) *aph(3')-IIIa*, % 68.75'inde (22/32) *ant(4')-Ia*, % 62.5'inde (20/32) *aph(2'')-Ib*, % 21.88'inde (7/32) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve % 9.38'inde (3/32) *aph(2'')-Ic* geni varlığı tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında YSAD *Enterococcus* izolatlarının hiçbirinde *aph(2'')-Id* geni varlığı gözlenmemiştir.

500 µg/mL gentamisin içeren besiyerlerinden izole edilen 7 YSGD *Enterococcus* izolatının 6'sında (% 85.71) *ant(6')-Ia*, 4'ünde (% 57.14) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, 4'ünde (% 57.14) *ant(4')-Ia* ve 2'sinde *aph(2'')-Ib* geni varlığı tespit edilmiştir. YSGD izolatlarında en sık karşılaşılan genotipin % 42.86 ile *ant(6')-Ia + aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* olduğu belirlenmiştir. 2000 µg/mL streptomisin içeren besiyerlerinden izole edilen 25 YSSD izolatının 24'ünde (% 96) *aph(3')-IIIa*, 22'sinde (% 88) *ant(6')-Ia*, 18'inde (% 72) *ant(4')-Ia*, 18'inde (% 72) *aph(2'')-Ib*, 3'ünde (% 12) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve 3'ünde (% 12) *aph(2'')-Ic* geni varlığı tespit edilmiştir. YSSD izolatlarında en sık karşılaşılan (% 40) genotipin *aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ib* olduğu belirlenmiştir. *E. durans* MGE63.1, *E. casseliflavus* MGM111.1, *E. faecium* MSE104.1 ve MSE111.2 suşları hariç YSAD izolatlarının geri kalanında fenotipik ve genotipik test sonuçları arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Antibiyotik dirençlilik son yıllarda bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunu teşkil etmektedir. Tedavi amaçlı veya verim artırıcı olarak çiftlik hayvanlarında kontrolsüz antibiyotik kullanımının hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan bakterilerin antibiyotik dirençlilik özelliklerinin artmasında temel etken olduğu düşünülmektedir. Özellikle taşınabilir genetik materyaller üzerinde bulunan antibiyotik direnç genlerinin insan sindirim sisteminde diğer bakteri türlerine aktarımı gıda zinciri aracılığı ile antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına neden olmaktadır. Aminoglikozidler enfeksiyonların tedavisinde kullanılan hayati öneme sahip ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenden dolayı yapılan tez çalışması

tüketici sağlığı açısından mevcut riski ortaya koymasý açısından önem taşımaktadır.

Yařamý tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde, önemli tedavi yöntemlerinden biri de aminoglikozitlerdir. Yüksek seviyede aminoglikozid direncinin fosfotransferazlar (APHs), asetiltransferazlar (AACs) ve nükleotidiltransferazlar (ANTs) olmak üzere 3 farklı aminoglikozid-modifiye edici enzim grubunun aktivitesi sonucu gerçekleştiği belirlenmiştir. Tez alışması kapsamında elde edilen verilerin literatür bilgisine katkı sağlayacağı ve halk sağlığı açısından değerlendirilerek daha sonra yapılacak çalışmalara da ışık tutacağı düşünölmektedir. Ayrıca, devam niteliğinde yapılacak yeni çalışmalar ile tavuk eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* suşlarının patojenitesinde etkili olan jelatinaz, sitolizin, agregasyon maddesi, hücre duvarı adhezinleri, hücre dışı yüzey proteinleri ve seks feromonları gibi virölens faktör genlerinin de araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abauelnağa, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M., 2016. Evaluation of the Extent of Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Fermented and Unfermented Foods. *Ann. Microbiol.*, 66, 577-585.
- Akçimen, B., 2010. Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Vankomisin Dirençli Enterokokların Pulsed Field Jel Elektroforez Yöntemiyle Genotip Tayini. Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 116 s, Adana.
- Akgül, Ö., Gülhan, T., Güdücüoğlu, H., 2016. Tavuk ve Martı Kökenli Enterokok Türlerinin Antibiyotik Dirençliliğinin Fenotipik ve Genotipik Analizi. Ankara Üniversitesi, Vet Fak Derg, 63, 235-244.
- Akpınar Kankaya D., 2017. Hayvansal Gıdalardan İzole Edilen Vankomisin Dirençli *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Weissella* Suşlarının Potansiyel Risk Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 213s, Isparta.
- Amini, F., Krimpour, H.A., Ghaderi, M., Vaziri, S., Ferdowsi, S., Azizi, M., Amini, S., 2018. Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Enterococcus* Strains in Kermanshah, Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 43(5), 487-493.
- Avci, M., Özden Tuncer, B., 2017. Safety Evaluation of Enterocin Producer *Enterococcus* sp. Strains Isolated from Traditional Turkish Cheeses. *Polish Journal of Microbiology*, Vol. 66, No 2, 223–233.
- Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J., 2000. Isolation and Characterisation of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and spp. From Cooked, Modified Atmosphere Packed, Refrigerated, Poultry Meat. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 83-94.
- Barbosa, J., Ferreira, V., Teixeira, P., 2009. Antibiotic Susceptibility of Enterococci Isolated from Traditional Fermented Meat Products. *Food Microbiology*, 26, 527-532.
- Barnes, HJ., Nolan, LK., Waillancourt, JP., 2008. Diseases of Poultry. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, 691-732.
- Barton, M.D., Wilkins, J., 2001. Antibiotic resistance in bacteria isolated from poultry. Rural Industries Research and Development Corporation Publication No 1/105 Report of RIRDC Project No USA-9A.
- Basustaoglu, A., 2004. Enterokoklarda Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları ve Direnç Sorunu. Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi 141-158. Ankara.

- Bayram, G., Delialioğlu, N., Emekdaş, G., 2011. Mersin İlinde Tüketime Sunulan Etlerden İzole Edilen Enterokok Türlerinin Prevalansı ve Tiplendirilmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 4, 12-16.
- Bertrand, X., Mulin, B., Viel, J. F., Thouverez, M., Talon, D., 2000. Common PFGE Patterns in Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* from Humans and Cheeses. Food Microbiology, 17, 543-551.
- Billströma, H., Lunda, B., Sullivan, A., Norda, C.E., 2008. Virulence and Antimicrobial Resistance in Clinical *Enterococcus faecium*. International Journal of Antimicrobial Agents, 32, 374-377.
- Bismuth, R., Courvalin, P., 2010. Aminoglycosides and Gram-positive bacteria: antibiogram. Portland.
- Bodil, L., 2003. Different Roles of *Enterococcus faecium* from a Human Perspective. Doktorsavhanling Vid Karolinska Intitutet, 3:435.
- Brigante, G., Luzzaro, F., Pini, B., 2007. Drug Susceptibility Testing of Clinical Isolates of *streptococci* and *enterococci* by the Phoenix Automated Microbiology System. BMC Microbiol. 7: 46-52.
- Bryskier, A., 2005. Antibiotics and antibacterial agents: classifications and structure-activity relationships. Antimicrobial agents. Washington, 13-38.
- Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F., 2001. Differences in Antibiotic Resistance Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Farm and Pet Animals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1374-1378.
- Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E., 1992. Rapid Genomic Fingerprinting of *Lactococcus lactis* Strains by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction with 32P and Fluorescent Labels. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1772-1775.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2008. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Collected from Dairy and Human Samples in North Italy. Food Control, 19, 886-892.
- Centeno, J.A., Menendez, S., Rodriguez-Otero, J.L., 1996. Main Microbial Flora Present as Natural Starters in Cebreiro Raw Cow's Milk Cheese (Northwest Spain). International Journal of Food Microbiology, 33, 307-313.
- Centron, D., Roy, P.H., 2002. Presence of a Group II Intron in a Multiresistant *Serratia marcescens* Strain that Harbors Three Integrons and a Novel Gene Fusion. Antimicrob Agents Chemother, 46: 1402-1409.

- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C., 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin Microbiol, 13, 686-707.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim, L., 2016. Diversity of Antibiotic Resistance Genes in *Enterococcus* Strains Isolated from Ready-to-Eat Meat Products. Journal of Food Science Vol. 00, Nr. 0.
- Chan, YY., Abd Nasir, MH., Yahaya, MA., Salleh, NM., Md Dan, AD., Musa, AM., Ravichandran, M., 2008. Low Prevalence of Vancomycin- and Bifunctional Aminoglycoside-Resistant Enterococci Isolated from Poultry Farms in Malaysia. Int J Food Microbiology;122(1-2):221-6.
- Channaiah, L.H., Subramanyam, B., McKinney, L.J., Zurek, L., 2010. Stored-Product Insects Carry Antibiotic-Resistant and Potentially Virulent Enterococcus. FEMS Microbiology Ecology, 74, 464-471.
- Charles, M.A.P., Franz, A.B., Silberhorn, M., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, H.W., 2001. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance Among Enterococci Isolated from Food. Applied and Environmental Microbiology, 67:4385-4389.
- Chingwaru, W., Mpuchane, S., Gashe, B., 2003. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Milk, Beef, and Chicken and Their Antibiotic Resistance. Journal of Food Protection, Vol. 66, No. 6, 931-936.
- Choi, J., Woo., 2013. Molecular Characterization of High-level Gentamicin-Resistant *Enterococcus faecalis* from Chicken Meat in Korea. International Journal of Food Microbiology, 165 ,1-6.
- Cocconcelli, P.S., Cattivelli, D., Gazzola, S., 2003. Gene Transfer of Vancomycin and Tetracycline Resistances Among *Enterococcs faecalis* During Cheese and Sausage Fermentations. International Journal of Food Microbiology, 88, 315- 323.
- Cortes, C., De la Fuente, R., Contreras, A., Sanchez, A., Corrales, L., Ruiz-Santa-Quiteria J.A., Oiden J.A., 2006. Occurrence and Preliminary Study of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Dairy Goats in Spain. Int J Food Microbiol., 110, 100-103.
- Cosentino, S., Pisano, M.B., Corda, A, Fadda, M.E., Piras, C., 2004. Genotypic and Technological Characterization of Enterococci Isolated from Artisanal Fiero Sardo Cheese. J Dairy Res., 71, 444-450.
- Courvalin, P., Carlier, C., 1981. Resistance Towards Aminoglycoside-aminocyclitol Antibiotics in Bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 8: 57-69.
- Çetinkaya, F., Elal, M., 2010. Yararları ve Riskleriyle Gıda Kaynaklı Enterokoklar. Uludag Univ. J. 29, 77-83.

- Çetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, Cg., 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 13, 686–707.
- Çıtak, S., Gündoğan N., Kala, E., 2009. Ankara İlindeki Dondurulmuş Et Ve Sebzelerde Koliform Ve Enterokokların Fekal İndikatör Bakteri Olarak Değerlendirilmesi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 66 (4): 145-151.
- De Vuyst, L., 2000. Technology Aspects Related to The Application of Functional Starter Cultures. Food Technology Biotechnology, 38(2), 105-112.
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M.R., Revets, H., 2003. Screening for Enterocins and Detection of Hemolysin and Vancomycin Resistance in Enterococci of Different Origins. International Journal of Food Microbiology, 84, 299-318.
- Demirgöl, F., Tuncer, Y., 2017. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry Fermented Sausage. Korean J. Food Sci. An. 37,670-681.
- Denktaş, S., 2017. Et ve Et Ürünlerinin Fonksiyonelliğinin Arttırılması. Kocatepe Vet J 10 (2): 106-117.
- Derbentli, S., 1998. Nozokomiyal Enterokok Enfeksiyonları. Galenos, 23, 14-17.
- Devriese, L.A., Pot, B., 1995. The genus *Enterococcus*. In Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Ed.), The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 327-367.
- Diarra, M.S., Rempel H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., Edward, T., 2010. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens. Applied and Environmental Microbiology, 8033–8043.
- Diken, K., 2016. Farklı Kaynaklardan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* İzolasyonu, Moleküller Tanısı Ve Genotiplendirilmesi. Biyoloji Anabilim Dalı, 54s, Yüksek Lisans Tezi, 54s, Kütahya.
- Dilik, Z., İstanbulluoğlu, E., 2010. Entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerindeki hayvanlardan izole edilen enterokokların fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar. Bornova Vet Bil Derg, 32, 37-46.
- Doğru, AK., Gencay, YE, Ayaz, ND., 2010b. Prevalance and Antibiotic Resistance Profiles of *Enterococcus* species in Chicken at Slaughter Level; Absence of *vanA* and *vanB* Genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. Research in Veterinary Science, 89, 153-158.

- Doğru, A.K., Gençay, Y.E., Ayaz, N.D., 2010a. Comparison of Virulence Gene Profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Chicken Neck Skin and Faeces Isolates. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16, 129-133.
- Doi, Y., Arakawa, Y., 2007. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism Against Aminoglycosides. Clin Infect Dis, 45, 88–94.
- Doming, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W., 2003. Methods Used for The Isolation, Enumeration, Characterisation and Identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for The Isolation and Enumeration. International Journal of Food Microbiology, 88, 147-164.
- Donabedian, S.M., Thal L.A., Hersherberger E., Perri M.B., Chow J.W., Bartlett P., Jones R., Joyce K., Rossiter S., Gay K., J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and Zervos, M.J., 2003. Molecular Characterization of Gentamicin-Resistant *Enterococci* in the United States: Evidence of Spread from Animals to Humans through Food. Journal of Clinical Microbiology, 1109–1113.
- Doyle, M.P., Busta F., Cords B.R., Davidson P.M., Hawke J., Hurd H.S., Isaacson R.E., Matthews K., Maurer J., Meng J., Montville T.J., Shryock T.R., Sofos J.N., Vidaver A.K., Vogel L., 2007. Antimicrobial Resistance: Implications for the Food System: An Expert Report, Funded by the IFT Foundation. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5(3), 71-137.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulance Determinants and Potential for Genetic Exchance Between Food and Medical Isolated. Applied and Enviromental Microbiology, 67, 1628-1635.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2002. A Variant Enterococcal Surface Protein Espfmin *Enterococcus faecium*; Distribution Among Food, Commensal, Medical, and Environmental Isolates. 216, 269-275.
- El-Ghazawy, I.F., Okasha, H.A.S., Mazloun, S.M., 2016. A Study of High Level Aminoglycoside Resistant *Enterococci*. African Journal of Microbiology Research, 10(16), 572-577.
- Eliopoulos, GM., 1989. Synergism and Antagonism. Infect Dis Clin North Am; 3, 399– 406.
- Erginkaya, Z., Yurdakul, N.E., Karakaş, A., 2007. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*' in Starter ve Probiyotik Kültür Özellikleri. Gıda Teknolojileri Derneği, 32(3), 137-142.
- Facklam, R.R., Sahm, D.F., Teixeira, L.M. 1999. *Enterococcus*. In: Murray, P.R., Baran,E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (Eds): Manual of Clinical Microbiolog . 7 th Edition, Washington, 297- 304.

- Facklam, RR., Teixeria, LM., 1998. *Enterococcus*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Vol 2 (Systematic Bacteriology). 9th edition. London, 669-682.
- Feizabadi, M.M., Maleknejad, P., Asgharzadeh, A., Asadi, S., Shokrzadeh, L., Sayadi, S., 2006. Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes Genes Among Isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. Microbial Drug Resistance Journal, 12, 265-268.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. Microbiology, 155(6), 1749-1757.
- Fontana, C., Gazzola, S., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., 2009. Population Structure and Safety Aspects of *Enterococcus* Strains Isolated from Artisanal Dry Fermented Sausages Produced in Argentina. Letters in Applied Microbiology, 49(3), 411-414.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst L., 2006. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. International Journal of Food Microbiology, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. *Enterococci* at the Crossroad of Food Safety. International Journal of Food Microbiology, 47, 1-24.
- Frazzon, A.P.G., Gama, B.A., Hermes, V., Bierhals, C.G., Pereira, R.I., Guedes, A.G., d'Azevedo, P.A., Frazzon, J. 2010. Prevalence of Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance Mediated by tetM and tetL Genes in *Enterococcus* spp. Isolated from Food in Southern Brazil. World J. Microb. Biot., 26, 365–370.
- Galimand, M., Sabtcheva S., Courvalin P., Lambert T., 2005. Worldwide Disseminated *armA* Aminoglycoside Resistance Methylase Gene is Borne by Composite Transposon Tn1548. Antimicrob Agents Chemother 49:2949–2953.
- Garrido, A.M., Galvez, A., Pulido, R.P. 2014. Antimicrobial Resistance in *Enterococci*. Journal of Infectious Diseases and Therapy, 2:4.
- Gavaldá, J., Onrubia, P., Gómez, M., Gomis, X., Ramírez, J., Len, O., 2003. Efficacy of Ampicillin Combined with Ceftriaxone and Gentamicin in the Treatment of Experimental Endocarditis due to *Enterococcus faecalis* with no High-level Resistance to Aminoglycosides. J Antimicrob Chemother. 52, 514-7.
- Giraffa, G., 2002. "Enterococci From Food", FEMS Microbiology Reviews, 26:163-171.
- Gomes, B., Esteves, C., Palazzo, I., Darini, A., Felis, G., Sechi, L., Franco, B., Martinis, E., 2008. Prevalence and Characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian Foods. Food Microbiology, 25, 668-675.

- Gülay, Z., 2003. Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibakteriyeller. ANKEM Derg 17 (No:3) : 192-204.
- Hammad, M., Hassan, H.A., Shimamoto, T., 2015. Prevalence, Antibiotic Resistance and Virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian Fresh Raw Milk Cheese. Food Control, 50, 815-820.
- Han, D., Tatsuya, U., Jeonghwan, J., Kyungtaek, L., 2011. The Occurrence of Virulence Traits Among High-level Aminoglycosides Resistant *Enterococcus* Isolates Obtained from Feces of Humans, Animals, and Birds in South Korea. International Journal of Food Microbiology, 144 , 387–392.
- Hanchi, H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R., 2018. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Enterococcus: Probiotic Potential and Safety Concerns*, Volume 9. Article 1791.
- Harada, T., Mito, Y., Otsuki, K., Murase, T., 2004. Resistance to Gentamicin and Vancomycin in *Enterococcal* Strains Isolated from Retail Broiler Chickens in Japan. Journal of Food Protection, Vol. 67, No. 10, Pages 2292–2295.
- Hashem, Y.A., Yassin, A.S., Amin, M.A. 2015. Molecular Characterization of *Enterococcus* spp. Clinical Isolates from Cairo, Egypt. Indian J. Med. Microbiol., 33, Suppl S1:80-6.
- Hayaloğlu, A., Erginkaya, Z., 2001. Gıda Endüstrisinde Kullanılan Laktik Asit Bakterileri. Bizim Büro Basımevi, 26s.
- Hirsh, D.C., Biberstein, E.L., 2004. *Streptococcus* and *Enterococcus*. In: Hirsh, D.C., MacLachlan, N.J., Walker, R.L. (Eds): Veterinary Microbiology. 2. ed. Blackwell Publishine Ltd., Ames, Iowa, USA, 159-169.
- Hollingshead, S., Vapnek, D., 1985. Nucleotide Sequence Analysis of a Gene Encoding a *streptomycin/spectinomycin* Adenylyltransferase. Plasmid, 13: 17–30.
- Holt, JG., Krieg, NR., Sneath, PHA., Staley, JT., Williams, ST., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Willkins.
- Hugas, M., Garigga, M., Aymerich, M.T., 2003a. Functionality of Enterococci in Meat Products. International Journal of Food Microbiology, 88, 2-3, 223-233s.
- Huys, G., Klaas, D'Haene, Collard, J.M., Swings, J., 2004. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food. Applied and Environmental Microbiology, 1555–1562.

- Jackson, CR., Fedorka-Cray, PJ., Barrett, JB., 2004. Use of the Genus and Species Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. J Clin Microbiol. 42(8) 3558-3565.
- Jackson, CR., Lombard, JE., Dargatz, DA., Fedorka-Cray, PJ. 2010. Prevalence, Species Distribution and Antimicrobial Resistance of *Enterococci* Isolated from US Dairy Cattle. Lett Appl Microbiol., 52:41–48.
- Jackson, R., Fedorka-Cray, P., B. Barrett, J., 2004. Genetic Relatedness of High-Level Aminoglycoside-Resistant *Enterococci* Isolated from Poultry Carcasses. 48:100–107.
- Jahan, M., Krause, D.O., Holley, R.A., 2013. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species from Meat and Fermented Meat Products Isolated by a PCR- Based Rapid Screening Method. International Journal of Food Microbiology, 163, 89-95.
- Jaimee, G., Halami PM. 2016. High Level Aminoglycoside Resistance in *Enterococcus*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* Species from Farm Animals and Commercial Meat Products. Annals of microbiology. 66, 101-110.
- Jensen, L.B., Frimodt-Møller, N., Aarestrup, F.M., 1999. Presence of *erm* Gene Classes in Gram-Positive Bacteria of Animal and Human Origin in Denmark. FEMS Microbiology Letters, 170(1), 151-158.
- Karabıyık, Z., 2011. Fermente Et Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinin Bazı Teknolojik Özellikleri ve Çoklu Antibiyotik Dirençliliği. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 122s, Ankara.
- Karakaş, A. 2005. Beyaz Peynir ve Fermente Sucuklardan *Enterococcus faecium*'un İzolasyonu ve Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 69s, Adana.
- Kasımoğlu-Doğru, A., Gencay, Y.E., Ayaz, N.D., 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; 153–158.
- Kaya, S., Çetin Es., Arıkan S., Tetik T., Kesbiç H., Yaşar S., 2007. Tavuklardan İzole Edilen *E.coli*, *klebsiella* ve Enterokoklarda Antibiotik Duyarlılık Durumları. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 14(2): 24-27.
- Khani, M., Fatollahzade, M., Pajavand, H., Bakhtiari, S., Abiri, R., 2016. Increasing Prevalence of Aminoglycoside-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates Due to the *aac(6')-aph(2'')* Gene: A Therapeutic Problem in Kermanshah, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology. 9(3):028923.

- Kim, Y.-J., Park, J.-H., Seo, K.H., 2018. Comparison of the Loads and Antibiotic-Resistance Profiles of *Enterococcus* species from Conventional and Organic Chicken Carcasses in South Korea. *Poultry Science*. 97:271–278.
- Kinley, B., Rieck, J., Dawson, P., Jiang, X., 2010. Analysis of *Salmonella* and *Enterococci* Isolated from Rendered Animal Products. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(1), 65-73.
- Klare, I., Konstabel C., Badstubner D., Werner G., Witte W., 2003. Occurrence and Spread of Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 269–290.
- Klein, G., 2003. “Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of *Enterococci* from Food and the Gastro-intestinal Tract”, *International Journal of Food Microbiology* 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. *Applied Environmental Microbiology*, 64(5) 1825- 1830.
- Klibi, N., Aouini, R., Borgo, F., Ben Said, L., Ferrario, C., Dziri, R., Boudabous, A., Torres, C. and Ben Slama, K., 2013. Antibiotic Resistance and Virulence of faecal *enterococci* Isolated from Food-producing Animals in Tunisia. *Ann. Microbiol.*, 65(2):695–702.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J., 2004. Enterococcal Infections: Host Response, Therapeutic and Prophylactic Possibilities. *Vaccine*, 22: 822- 830.
- Koluman, A., Akan, L.S., Çakiroğlu, F.P., 2009. Occurrence and Antimicrobial Resistance of *Enterococci* in Retail Foods. *Food Control*, 20, 281-283.
- Koneman, E.W., 2005. *Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., 1997. The Gram Positive Cocci Part II *Streptococci*, *Enterococci* and The *Streptococci* Like Bacteria. In *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (5th ed.) (577-629). Lippincott, 1535p. Philadelphia.
- Lan, YF., Zhang, Li, K., Huang, SC., Rehman, M.U., Zhang, LH., Luo, HQ., Wang, L., Han, ZQ., Shahzad, M., Li, JK., 2016. Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistant *Enterococci* Isolated from Tibetan Pigs. *Pakistan Veterinary Journal*, 36(4), 503-505.
- Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., de las Rivas, B., 2013. Technological and Safety Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Spanish Dry-Cured Sausages. *Meat Science*, 95, 272-280.

- Lefort, A., Saleh-Mghir, A., Garry, L., Carbon, C., Fantin, B., 2000. Activity of LY333328 Combined with Gentamicin in Vitro and in Rabbit Experimental Endocarditis Due to Vancomycin-Susceptible or Resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3017-3021.
- Leroy, F., Moreno MRF., De Vuyst L., 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, An Interesting Bacteriocin Producer to Be Used As A Co-culture in Food Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:235-240.
- Li, W., Li, J., Wei, Q., Hu, Q., Lin, X., Chen, M., Ye, R., Lv, H., 2015. Characterization of Aminoglycoside Resistance and Virulence Genes among *Enterococcus* spp. Isolated from a Hospital in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 3014-3025.
- Li, X., 2005. Quinolone Resistance in Bacteria: Emphasis on Plasmid-mediated mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 453-463.
- Linaje, R., Coloma, M., D., Perez-Martinez, G., Zuniga, M., 2004. Characterization of Faecal *Enterococci* from Rabbits for the Selection of Probiotic Strains. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 761-771.
- Linden, Peter K., Miller Carole B., 1999. Vancomycin-resistant Enterococci: the Clinical Effect of a Common Nosocomial Pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Volume 33, Issue 2, Pages 113-120*.
- Lortholory, O., Tod, M., Choen, Y., Paitjean, O., 1995. Aminoglycosides. *Med Clin North Am* 79:761-78.
- Malek, R., El-Attar, A., Mohamed, M., Anwar, S., El Soda, M. and Béal, C., 2012. Technological and Safety Properties Display Biodiversity Among Enterococci Isolated from Two Egyptian cheeses, "Ras" and "Domiat". *Int. J. Food Microbiol.*, 153: 314-322.
- Manero, A., Blanch, A.R., 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4425-4430.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, M.T., 2005. "Genetic Diversity and Safety Aspects of Enterococci from Slightly Fermented Sausages". *Journal of Applied Microbiology*, 98:1177-1190.
- Maschieto, A., Martinez, R., 2004. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from the Intestinal Tract of Patients from a University Hospital in Brazil. *Cruz vol.99 no.7, Rio de Janeiro Nov*.
- Mathur, S., Singh R., 2005. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria a Review. *Int J Food Microbiol.*, 105:281-295.

- Mendiratta, D.K., Kaur, H., Deotale, V., Thamke, D.C., Narang, R., Narang, P., 2008. Status of High Level Aminoglycoside Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in a Rural Hospital of Central India. Indian Journal of Microbiology, 26, 369-371.
- Messi, P., Guerrieri E., Niederhausern S., Sabia C., Bondi M., 2006. Vancomycine Resistant Enterococci (VRE) in Meat and Environmental Samples. Int J Food Microbiol., 107, 218-222.
- Miller, W.R., Munita, J.M., and Arias, C.A., 2014. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Enterococci. Expert Rev Anti Infect Ther. 12(10): 1221-1236.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., 2006. Technological and Molecular Characterisation of Enterococci Isolated from North-West Italian Dairy Products. International Dairy Journal, 16, 867-875.
- Moreno, M.R.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. International Journal of Food Microbiology, 106, 1-24.
- Morgen, S., Ross, R., P., Hill, C., 2002. Preservation and Fermentation: Past, Present and Future. International Journal of Food Microbiology, 79, 3-16.
- Murray, B., 1990. The Life and Times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev, 3 (1): 46-65.
- Murray, B.E., 1998. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. Emerging Infectious Diseases. 4:37-47.
- Muş, T., 2014, Hayvansal Kaynaklı Gıdalarda Enterokokların Varlığı, Tür Düzeyinde idendifikasyonları. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyen Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 60s, Bursa.
- Niu, H., Yu H., Hu T., Tian G., Zhang L., Guo X., Hu H., Wang Z., 2016. The Prevalence of Aminoglycoside-modifying Enzyme and Virulence Genes among Enterococci with High-level Aminoglycoside Resistance in Inner Mongolia, China. Brazilian Journal of Microbiology. 47, 691-696.
- Novais, C., Coque, T.M., Costa, M.J., Sousa, J.C., Baquera, F., Peixe, L.V., 2005. High Occurrence and Persistence of Antibiotic-resistant Enterococci in Poultry Food Samples in Portugal. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56(6):1139-1143.
- Nowakiewicz, A., Ziolkowska, Trościańczyk A., Zieba, P., Gnat S., 2016. Determination of Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* Strains Isolated from Poultry and their Genotypic

Characterization by ADSRRS-fingerprinting. Institute of Biological Bases of Animal Diseases, Sub-Department of Veterinary Microbiology. Poultry Science, 96:986–996.

- O'Connor, M., De Stasio, EA., Dahlberg, AE., 1991. Interaction between 16S Ribosomal RNA and Ribosomal Protein S12: Differential Effects of *Paromomycin* and Streptomycin. 73:1493– 1500.
- Onaran, B., 2017. Piliç Etlerinde Vankomisin Dirençli Enterokokların Varlığının Ve Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi., Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gıda Hijyeni Ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 120s, Ankara.
- Oravcova, V., Ghosh, A., Zurek, L., Bardon, J., Guenther, S., Cizek, A., Literak, I., 2013. Vancomycin-Resistant Enterococci in Rooks (*Corvus frugilegus*) Wintering Throughout Europe. Environmental Microbiology, 15(2), 548-556.
- Ozden, Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y., 2013. Occurrence of Enterocin Genes, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance 3 Bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. Turk J Biol, 37, 443-449.
- Padmasini E., Padmaraj R., Ramesh S. S., 2014. High Level Aminoglycoside Resistance and Distribution of Aminoglycoside Resistant Genes among Clinical Isolates of *Enterococcus* Species in Chennai, India. The Scientific World Journal Volume, Article ID 329157, 5 pages.
- Papamanoli, E., Tzanestakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003. Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from a Greek Dry-Sausages in Respect of Their Technological and Probiotic Properties. Meat Science, 65(2), 859-867.
- Pedonese, F., Innocenti E., Nuvoloni R., Sartini L., D'Ascenzi C., Cerri D., Rindi S., 2005. Occurence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Foods of Animal Origin Purchased in Tuscany. Vet Res Commun, 29, 347-349.
- Perez-Hernandez, X., Mendez-Alvarez, S., Claveria-Martin, F. 2002. A PCR Assay for Rapid Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 42, 273-277.
- Petsaris, O., Mischczak F., Gicquel-Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Humbert, F., Sanders, P., Leclercq, R., 2005. "Combined Antimicrobial Resistance in *Enterococcus faecium* Isolated from Chickens", Applied and Enviromental Microbiology, 71(5): 2796-2799.
- Pourcel, G., Sparo, M., Corso, A., Delpech, G., Galletti, P., de Luca, M.M., Bernstein, J., Schell, C., Lissarrague, S., Basualdo, J.Á., 2017. Molecular Genetic

Profiling of Clinical and Foodborne Strains of Enterococci with High Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin. Clin Microbiol 6: 272.

- Psoni, L., Kotzamanides C., Andrighetto C., Lombardi A., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., 2006. Genotypic and Phenotypic Heterogeneity in *Enterococcus* Isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. Int J Food Microbiol., 109, 109-120.
- Ramin, B., Asadpour, L., Tehrani, H.F., Amirmozafari, N., 2017. Detection and Distribution of Various HLAR Gene in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by Multiplex-PCR. Modern Medical Laboratory Journal, 1(2), 68-76.
- Ramirez, M., Tolmasky M., 2010. Aminoglycoside Modifying Enzymes. Drug Resist Updat. 13(6): 151-171.
- Riboldi, G.P., Frazzon J, Azevedo P.A., Frazzon A.P.G., 2009. Antimicrobial Resistance Profile of *Enterococcus* spp. Isolated from Food in Southern Brazil. Braz J Microbiol., 40, 125-128.
- Robert, C., Moellerig, R.C., 2005. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc species*. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. Sixth edition. Elsevier Churchill Livingstone: 2411-2417.
- Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Teresa, M.C., Arioli, S., Randazzo, C.L., 2018. *Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano Cheese Types: A Snapshot of Their Antibiotic Resistance Distribution. Food and Chemical Toxicology, 120, 277-286.
- Sahoo, T.K., Jena P.K., Nagar N., Patel A.K., Seshadri S., 2015. In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from the Gut of Labeo rohita and Catla catla. Probiotics & Antimicro. Prot. 7:126-136.
- Sallem, R.B., Klibi, N., Klibi, A., Said, B.L., Dziri, R., Boudabous, A., Torres, C., Slama, K.B., 2016. Antibiotic Resistance and Virulence of Enterococci Isolates from Healthy Humans in Tunisia. Ann. Microbiol., 66, 717-725.
- Sanlibaba, P., Tezel B. U., Senturk E., 2018. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Chicken in Turkey. Korean J. Food Sci. An. 38(2):391-402.
- Sardan, Y.Ç., 2004. Enterokoklarda Direnç Sorunu. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara:10-16.
- Savaşan, S., Kaya O., Kırcan Ş., Çiftçi A., 2008. Balık Kökenli *Enterococcus faecalis* Suşlarının Antibiyotik Dirençlilikleri. Ankara Üniv Vet Fak Derg., 55, 107-110.

- Scaglione F., Dugnani S., Demartini G., Arcidiacono M.M., Cocuzza C.E., Fraschini F., 1995. Bactericidal Kinetics of an *in vitro* Infection Model of Once-daily Ceftriaxone Plus Amikacin Against Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Chemotherapy* 41:239-246.
- Shepard, B.D., Gilmore, M.S., 2002. Antibiotic-Resistant Enterococci: the Mechanisms and Dynamics of Drug Introduction and Resistance. *Microbes and Infection*, 4, 215-224.
- Shete, V., Grover, N., Kumar, M., 2017. Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance among Enterococcal Isolates. *Journal of Pathogens*, 2017, 5.
- Singh, K.V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 1998. Generation and Testing of Mutants of *Enterococcus faecalis* in Mouse Peritonitis Model. *Journal of Infectious Diseases*, 178(5), 1416-1420.
- Songer, J.G., Post K.W., 2015. Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi, Anđ Ö. ve Özgür NY. (Edt), Nobel Tıp Kitapevleri, s 113-120.
- Sood, S., Malhotra M., Das B.K., Kapil A., 2008. Enterococcal Infections & Antimicrobial Resistance. *Indian J Med Res*, 128: 111-121.
- Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M., Marcináková, M., 2008. Occurrence of the Structural Enterocin A, P, B, L50B Genes in Enterococci of Different Origin. *Veterinary Microbiology*, 132, 293-301.
- Sustackova, A., Napravnikova, E., Schlegelova, J., 2004. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* spp. Isolates from Raw Beef and Meat Products, *Folia Microbiology*, 49(4):411-417.
- Sümerkan, B., 2002. Vankomisine Dirençli Enterokoklar. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 10(2), 1-5.
- Şahin, S., 2012. Tavuk Ürünlerinden İzole Edilen *Enterococcus*'lardaki Antibiyotik Direnci ve *E.coli*'deki Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz Araştırılması. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Şentürk, E., 2017. Antimikrobiyel Aktiviteye Sahip Enterokok Suşlarının Moleküler Düzeyde Tanımlanması ve Antibiyotik Dirençlilik Düzeylerinin Saptanması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 124s, Ankara.
- Tansuphasin, U., Khaminthakul D., Pandii W., 2006. Antibiotic Resistance of Enterococci Isolated from Frozen Foods and Environmental Water. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37(1): 162-70.

- Teixeira, L.M., Carvalho, M.G.S., Facklam, R.R., 2009. Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Kitapçılık, 1:430-438, Ankara.
- Terkuran, M., 2013. Gıda ve Klinik Kaynaklı Enterokokların Vankomisin Direnç Özelliklerinin, Genetik Orjinlerinin ve Virülans Faktörlerinin Karşılaştırılması., Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi. 132s, Adana.
- Toğay, S.Ö., 2010. Doğal Fermente Gıdalar ve Anne Sütünden Enterokokların- İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bunların Probiyotik Kültür Olarak Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması., Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 145s, Ankara.
- Toğay, S.Ö., Temiz, A., Çelebi, A., Açık, L., Yalçın, S.S., 2014. Investigation of Potential Virulence Genes and Resistance Characteristic of *Enterococcus faecalis* Isolates form Human, Milk and Colostrum Samples. Turkish Journal of Biology, 38, 357-364.
- Toth, M., Chow, J.W., Mobashery, S., Vakulenko, S.B., 2009. Source of Phosphate in the Enzymic Reaction as a Point of Distinction among Aminoglycoside 2'' phosphotransferases. J Biol Chem 284:6690-6696.
- Tuncer, M., Özden Tuncer B., Tuncer Y., 2014. Çiğ Sütten İzole Edilen Enterosin B Üreticisi *Enterococcus faecalis* MYE58 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi. GIDA/ The Journal of Food. 39 (5), 275-282.
- Tuncer, Y., 2009. Some Technological Properties of Phenotypically Identified Enterococci Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. African Journal of Biotechnology, 8, 7008-7016.
- Tümer, G., Baykam N., Esener H., Yılmaz Ş. M., Dokuzoğuz B., 2013. Nozokomiyal Vankomisine Dirençli Enterokok Kolonizasyonu ve Enfeksiyonunda Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. Flora, 18(3):134-140.
- Tyson, G.H., Sabo, J.L., Rice-Trujillo, C., Hernandez, J., McDermott, P.F., 2018. Whole-Genome Sequencing Based Characterization of Antimicrobial Resistance in *Enterococcus*. Pathogens and Disease, 76(2), 1-5.
- Uttley, AHC., Collins CH., Naidoo J., George RC., 1988. Vancomycin Resistant Enterococci. Lancet; 1:57-58.
- Vakulenko, S.B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A.M., Zervos, M.J., Lerner, S.A., Chow, J.W., 2003. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47 (4), 1423-1426.
- Valenzuela, A., Omar, N., Abriouel, H., Lopez, R., Veljovic, K., Canamero, M., Topisirovic, M., Galvez, A., 2009. Virulence Factors, Antibiotic Resistance

and Bacteriocins in Enterococci from Artisan Food of Animal Origin, Food Control, 20:381-385.

- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrigheetto, C., Knijff, E., Torrianis., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M.A.P., Moreno, M.R.F., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzapfel, W.H., 2002. Intraspecies Genomic Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity. Applied and Environmental Microbiology, 68(3), 1381-1391.
- Vetting, M.W., LP, S.d.C., Yu, M., Hegde, SS., Magnet, S., Roderick SL., Blanchard JS., 2005. Structure and Functions of the GNAT Superfamily of Acetyltransferases. Arch Biochem Biophys; 433:212– 226.
- Veyssier, P., Bryskier, A., 2005. Aminocyclitol Aminoglycosides Antimicrobial Agents. ASM Press; Washington. p. 453-469.
- Wegener, H.C., Madsen, M., Nielsen, N. and Aarestrup, F.M., 1997. Isolation of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* from Food. International Journal of Food Microbiology, 35, 57-66s.
- Wiley, B., Jones, R.N., Mcgeer, A., Witte, W., French, G., Roberts, R.B., Jenkis, S.G. Nadler, H. Low, D.E., 1999. Practical Approach to the Identification of Clinically Relevant *Enterococcus* Species. Diagn. Microbiol Infect Dis., 34, 165-171.
- Wright, G.D., Thompson, P.R., 1999. Aminoglycoside Phosphotransferases: Proteins, Structure and Mechanism. Frontiers Bioscience, 4, 9–21.
- Yalanca, İ., 2009. Geleneksel Et Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 50s, Adana.
- Yang, H., Chen, S., White D.G., Zhao S., McDermott P., Walker R., Meng J., 2004. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China. Journal of Clinical Microbiology, 42(8), 3483-3489.
- Yao, J., Moellering, R., 2007. Antibacterial Agents. Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Press; Washington, p. 1077-1113.
- Yıldız, C., 2012, Tavuk Etlerlerinde *Enterococcus* spp.'lerin Prevelansı, Biyofilm Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans Tezi, 1-103.

- Yogurtcu, NN., Tuncer, Y., 2013. Antibiotic Susceptibility Patterns of *Enterococcus* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Int J Dairy Technol.*, 66: 236-242.
- Yoğurtçu, N., 2011. Tulum Peynirinden Enterokok Suşlarının İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 70s, Isparta.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J., Hwang, H-J., 2008. Properties and Safety Aspect *Enterococcus faecium* Strains Isolated from *Chungkukjang*, a Fermented Soy Product. *LWT- Food Science and Technology*, 41(5), 925-933.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S., Kojima, A., 2000. Antimicrobial Susceptibilities of Enterococci Isolated from Faeces of Broiler and Layer Chickens. *The Society for Applied Microbiology*, 31, 427-432.
- Yousif, N.M.K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swings, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., 2005. Molecular Characterization, Technological Properties and Safety Aspects of Enterococci from 'Hussuwa', an African Fermented Sorghum Product. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 216-228.
- Yüceer, Ö., Özden, Tuncer, B., 2015. Determination of Antibiotic Resistance and Biogenic Amine Production of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Turkish Sausage (Sucuk). *Journal of Food Safety*, 35, 276-285.
- Yüksel, F.N., Akçelik, N., Akçelik, M., 2015. Incidence of Antibiotic Resistance and Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains, Isolated from Traditional Cheeses in Turkey. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 30(4), 206-2154.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meltem YALÇIN
Doğum Yeri ve Yılı : Antalya, 1994
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : meltemyalcin1505@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Doktor İlhami Tankut Anadolu Lisesi, 2012
Lisans : SDÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2016

Mesleki Deneyim

PROANALİZ LABORATUVARLAR GRUBU	2013	(3 AY)
PROANALİZ LABORATUVARLAR GRUBU	2014	(3 AY)
PROANALİZ LABORATUVARLAR GRUBU (STAJ)	2015	(2 AY)
HASKAL GROUP (STAJ)	2015	(2 AY)
MANAVGAT MYO	2018 -	(Halen)

Yayınlar

Meltem Yalçın, Yasin Tuncer. 2017. Antalya ve Isparta İllerinde Perakende Satışı Yapılan Tavuk Etlerinden Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli Enterokok İzolasyonu ve Tür Düzeyinde Tanısı. II. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi. 13 - 14 Aralık 2017, Antalya.

Meltem Yalçın, Yasin Tuncer. 2018. Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) *Enterococcus* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi. 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018). 02-05 May 2018, Burdur.

Meltem Yalçın, Yasin Tuncer. 2018. Geleneksel Peynirlerden İzole Edilen Vankomisin-Dirençli Enterokoklarda (VRE) *vanA* ve *vanB* Genleri Varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Araştırılması. The International Congress of Eurasian Natural Nutrition and Healthy 2018. 12-15 July 2018, Ankara.