

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVUK VE MARTI KAYNAKLI ENTEROKOK TÜRLERİNİN  
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE  
GENOTİPİK ANALİZİ**

Veteriner Hekim Ömer AKGÜL  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
DOKTORA TEZİ

**DANIŞMANLAR**

**1. DANIŞMAN**

Doç. Dr. Timur GÜLHAN

**2. DANIŞMAN**

Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAVUK VE MARTI KAYNAKLI ENTEROKOK TÜRLERİNİN  
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİNİN FENOTİPİK VE  
GENOTİPİK ANALİZİ**

Veteriner Hekim Ömer AKGÜL  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
DOKTORA TEZİ

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

TEZ KABUL TARİHİ  
.../.../2014

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında ilgisini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, çalışmalarına yön vererek bana her zaman yol gösteren, değerli bilim insanları, saygıdeğer danışmanlarım Doç. Dr. Timur GÜLHAN ve Doç. Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU'na, tez izleme komitesi başkanı Prof. Dr. Yakup Can SANCAK'a, çalışmamın moleküler aşamasında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Barış OTLU'ya, her konuda yardımcı olan ve manevi desteğini esirgemeyen babam Prof. Dr. Yakup AKGÜL'e, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D. öğretim üyeleri ve personeline, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı öğretim üyeleri ve personeline, manevi desteğini gördüğüm Doç. Dr. Loğman ASLAN'a ve moleküler çalışmalarında bana ayırdığı zaman ve sağladığı katkılardan dolayı Doç. Dr. Ülkü ÖZBEY'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bana sonsuz desteğini sunan aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Kabul ve Onay .....                                                                                                                            | II   |
| Teşekkür .....                                                                                                                                 | III  |
| İçindekiler .....                                                                                                                              | IV   |
| Tablolar Listesi .....                                                                                                                         | VIII |
| Şekiller Listesi .....                                                                                                                         | IX   |
| Simgeler ve Kısaltmalar .....                                                                                                                  | X    |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                                 | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                                                                                        | 5    |
| 2.1. Tarihçe .....                                                                                                                             | 5    |
| 2.2. Mikrobiyolojik Özellikler .....                                                                                                           | 6    |
| 2.2.1. Görünüm ve boyanma özellikleri .....                                                                                                    | 7    |
| 2.2.2. Üreme özellikleri ve fizyolojik karakterleri .....                                                                                      | 7    |
| 2.2.3. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri .....                                                                                      | 10   |
| 2.2.4. Sınıflama ve identifikasyon .....                                                                                                       | 11   |
| 2.2.5. Genom özellikleri .....                                                                                                                 | 15   |
| 2.2.6. Genetik bilgi transferi .....                                                                                                           | 16   |
| 2.3. Virülans Faktörleri .....                                                                                                                 | 17   |
| 2.3.1. Hemolizin/Sitolizin .....                                                                                                               | 19   |
| 2.3.2. Jelatinaz .....                                                                                                                         | 20   |
| 2.3.3. Enterokokal surface protein ( <i>esp</i> ) .....                                                                                        | 20   |
| 2.3.4. Agregasyon faktör ( <i>Af</i> ) .....                                                                                                   | 21   |
| 2.3.5. MSCRAMM Ace (Microbial surface component recognizing<br>adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from <i>Enterococci</i> )<br>..... | 22   |
| 2.3.6. Kapsül ve hücre duvarı polisakkaritleri .....                                                                                           | 22   |
| 2.3.7. Lipoteikoik asit (LTA) .....                                                                                                            | 22   |
| 2.3.8. Süperoksitler .....                                                                                                                     | 23   |
| 2.3.9. Seks feromonları .....                                                                                                                  | 23   |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.10. Hyaluronidaz ( <i>hyl</i> ) .....                                    | 24 |
| 2.3.11. <i>Enterococcus faecalis</i> antijen A ( <i>EfaA</i> proteini) ..... | 24 |
| 2.3.12. Enterocin AS-48 .....                                                | 25 |
| 2.3.13. Antibiyotik direnci .....                                            | 25 |
| 2.4. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları.....                 | 25 |
| 2.4.1. İntrinsik direnç .....                                                | 26 |
| 2.4.1.1. $\beta$ -Laktam direnci .....                                       | 26 |
| 2.4.1.2. Aminoglikozit direnci .....                                         | 26 |
| 2.4.1.3. Diğer antibiyotiklere direnç .....                                  | 27 |
| 2.4.2. Ekstrinsik direnç .....                                               | 27 |
| 2.4.2.1. $\beta$ -laktam direnci .....                                       | 27 |
| 2.4.2.2. Aminoglikozid direnci .....                                         | 28 |
| 2.4.2.3. Kloramfenikol direnci .....                                         | 29 |
| 2.4.2.4. Tetrasiklin direnci .....                                           | 29 |
| 2.4.2.5. Kinolon direnci .....                                               | 29 |
| 2.4.2.6. MLSB (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) direnci         | 29 |
| 2.4.2.7. Oksazolidinon direnci .....                                         | 30 |
| 2.4.2.8. Glikopeptit direnci .....                                           | 30 |
| 2.4.2.8.1. Fenotipik tanımlama .....                                         | 30 |
| 2.4.2.8.2. Genotipik tanımlama .....                                         | 32 |
| 2.4.2.8.2.1. VanA glikopeptit direnci .....                                  | 32 |
| 2.4.2.8.2.2. VanB glikopeptit direnci .....                                  | 34 |
| 2.4.2.8.2.3. VanC glikopeptit direnci .....                                  | 35 |
| 2.4.2.8.2.4. VanD glikopeptit direnci .....                                  | 35 |
| 2.4.2.8.2.5. VanE glikopeptit direnci .....                                  | 36 |
| 2.4.2.8.2.6. VanG glikopeptit direnci .....                                  | 36 |
| 2.4.2.8.2.7. Vankomisin bağımlı enterokoklar (VDE) .....                     | 37 |
| 2.5. Kolonizasyon ve Risk Faktörleri .....                                   | 37 |
| 2.6. Enterokok Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi .....                       | 40 |
| 2.7. Enterokokal Enfeksiyonlar .....                                         | 56 |
| 2.8. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri .....                             | 60 |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8.1. Fenotipik tiplendirme metotları .....                                                             | 62 |
| 2.8.1.1. Biyotiplendirme .....                                                                           | 62 |
| 2.8.1.2. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamidjel elektroforezi (SDS-PAGE) ile protein fingerprinting ..... | 63 |
| 2.8.1.3. Multi-lokus enzim elektroforezi (MLEE) .....                                                    | 64 |
| 2.8.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri .....                                                        | 65 |
| 2.8.1.5. Serotiplendirme .....                                                                           | 65 |
| 2.8.2. Genotipik tiplendirme metotları .....                                                             | 66 |
| 2.8.2.1. Restriksiyon enzim analizi (REA) bazlı yöntemler .....                                          | 67 |
| 2.8.2.1.1. Plasmid DNA profil analizi .....                                                              | 67 |
| 2.8.2.1.2. Pulsed field gel elektroforezi (PFGE) .....                                                   | 67 |
| 2.8.2.1.3. Ribotiplendirme .....                                                                         | 69 |
| 2.8.2.2. Nükleik asit amplifikasyonu bazlı (NAAB) teknikler .....                                        | 69 |
| 2.8.2.2.1. Polymerase chain reaction (PCR) bazlı teknikler .....                                         | 70 |
| 2.8.2.2.1.1. Multipleks PCR .....                                                                        | 71 |
| 2.8.2.2.2. Random amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR ve arbitrarily primed (AP) PCR .....              | 71 |
| 2.8.2.2.3. Spesifik ve random amplifikasyon (SARA) PCR .....                                             | 72 |
| 2.8.2.2.4. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) .....                                           | 72 |
| 2.8.2.2.5. Repetitive polimeraz zincir reaksiyonu (REP-PCR) .....                                        | 72 |
| 2.8.2.2.6. İntergenik rRNA spacer bölgeleri PCR (ITS-PCR) .....                                          | 73 |
| 2.8.2.2.7. Diğer amplifikasyon bazlı yöntemler .....                                                     | 73 |
| 2.8.2.3. Dizi analizi yöntemleri .....                                                                   | 74 |
| 2.8.2.3.1. Parsiyeldizi analizi .....                                                                    | 74 |
| 2.8.2.3.2. Multilokus sequence tiplendirme (MLST) .....                                                  | 74 |
| 2.9. Enterokok Enfeksiyonlarının Tedavisi .....                                                          | 75 |
| 2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri .....                                     | 78 |
| 2.11. Tavuklar ve Özellikleri .....                                                                      | 83 |
| 2.12. Martılar ve Özellikleri .....                                                                      | 85 |
| 2.13. Çalışmanın Amacı .....                                                                             | 90 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                                                 | 91 |

|                                                  |     |
|--------------------------------------------------|-----|
| 3.1. Gereç .....                                 | 91  |
| 3.1.1. İzolasyon materyali .....                 | 91  |
| 3.1.2. Besiyerleri .....                         | 93  |
| 3.1.3. Referans enterokok suşları .....          | 93  |
| 3.1.4. Antibiyotik diskleri .....                | 94  |
| 3.1.5. PCR araç ve gereçleri .....               | 94  |
| 3.2. Yöntem .....                                | 95  |
| 3.2.1. İzolasyon .....                           | 95  |
| 3.2.2. İdentifikasyon .....                      | 95  |
| 3.2.3. Moleküler karakterizasyon .....           | 96  |
| 3.2.4. İstatistiksel analiz .....                | 100 |
| 4. BULGULAR .....                                | 101 |
| 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları ..... | 101 |
| 4.2. Antibiyogram Testi Sonuçları .....          | 102 |
| 4.3. 16S rRNA Analiz Sonuçları .....             | 106 |
| 4.4. Van Genlerinin Analiz Sonuçları .....       | 107 |
| 4.5. <i>Esp</i> Geni Analiz Sonuçları .....      | 110 |
| 4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları .....        | 110 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                       | 111 |
| ÖZET .....                                       | 153 |
| SUMMARY .....                                    | 154 |
| KAYNAKLAR .....                                  | 155 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                   | 185 |

## TABLolar LİSTESİ

|                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tablo 1. Enterokokların sınıflandırılması                                                                                                                    | 11  |
| Tablo 2. <i>Enterococcus</i> cinsi içerisinde yer alan türler                                                                                                | 12  |
| Tablo 3. Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri                                                                                                          | 14  |
| Tablo 4. Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri                                                                                                    | 32  |
| Tablo 5. Tavukların sınıflandırılması                                                                                                                        | 85  |
| Tablo 6. Martıların sınıflandırılması                                                                                                                        | 90  |
| Tablo 7. Tavuk ve martı dışkı örneklerinin toplandığı bölgeler                                                                                               | 92  |
| Tablo 8. mPCR’da kullanılan primerlerin oligonükleotid dizilimleri                                                                                           | 96  |
| Tablo 9: Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen enterokok türleri                                                                                   | 101 |
| Tablo 10. Tavuk ve martı orijinli enterokok izolatlarının antibiyogram sonuçları                                                                             | 103 |
| Tablo 11. Tavuk ve martı orijinli <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranlarının karşılaştırılması                | 104 |
| Tablo 12. Tavuk ve martı orijinli <i>E. casseliflavus/gallinarum</i> ve <i>E. durans</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranlarının karşılaştırılması | 105 |
| Tablo 13. Tavuk ve martı orijinli <i>E. hirae</i> izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranlarının karşılaştırılması                                        | 106 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 1. Enterokokların PYR test görüntüsü                                                         | 8   |
| Şekil 2. Enterokokların bile eskulin agar (BEA) görüntüleri                                        | 9   |
| Şekil 3. <i>E. faecalis</i> hücre duvarındaki polimerlerin şematik görüntüsü                       | 10  |
| Şekil 4. Enterokok türleri identifikasyon şeması                                                   | 15  |
| Şekil 5. Seks feromon sistemi transfer mekanizması                                                 | 24  |
| Şekil 6. VanA operonu                                                                              | 33  |
| Şekil 7. Avrupa’da VR <i>E. faecalis</i> prevalansı                                                | 42  |
| Şekil 8. Bazı martı çeşitleri                                                                      | 89  |
| Şekil 9. Tavuk ve Martı dışkı örneklerinin azide dextrose broth’deki görüntüsü                     | 93  |
| Şekil 10. Örnek enterokok izolatının antibiyogram test sonucu                                      | 102 |
| Şekil 11. Tavuk orijinli enterokok türlerinin 16S rRNA PCR sonucu                                  | 107 |
| Şekil 12. Tavuk orijinli <i>vanC1</i> pozitif <i>E. casseliflavus/gallinarum</i> PCR görüntüsü     | 108 |
| Şekil 13. Tavuk orijinli <i>vanC2/3</i> pozitif <i>E. casseliflavus/gallinarum</i> PCR görüntüsü   | 109 |
| Şekil 14. Martı orijinli <i>vanA</i> pozitif <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> PCR görüntüsü | 109 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AAC (6')-IeAPH(2'): 6' Asetil transferaz-2' fosfotransferaz

AF: Agregasyon faktör

AFLP: Amplified fragment length polimorfizm

AP-PCR: Arbitrarily primed PCR

ARDRA: Amplified rDNA restriction analysis

ATCC: American type culture collection

BEA: Bile-eskulin agar

BHIB: Brain-heart infusion Broth

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CDC: Centers for disease control

CNA: Columbia-kolistin nalidiksik agar

ÇİD: Çoklu ilaç direnci

DGGE: Denaturing gradient jel elektroforezi

EARSS: European antimicrobial surveillance system

EfaA: *Enterococcus faecalis* antigen A

Eh: Oksidasyon redüksiyon potansiyeli

ESP: Enterokokal surface protein

FTIR: Fourier transform infrared

GRE: Glikopeptit rezistan enterokok

HICPAC: Hospital infection control practices advisory committee

HLAR: High level aminoglikozid direnci

HLGR: High level gentamisin direnci

Hyl: Hyaluronidaz

IL: İnterlökin

ILLM: Inductive learning by logic minimisation system

ITS-PCR: İntergenik rRNA spacer PCR

LAPase: Leucinamino peptidaz

LTA: Lipoteikoik asit

MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis  
MLSB: Makrolid linkomisin streptogramin B  
MLST: Multilocus sequence typing  
MMP: Matriks metallo proteinaz  
MNV: Metronidazol neomisin vankomisin  
MRS: Proton Manyetik rezonans spektroskopisi  
MSCRAMM Ace: Microbial surface komponent recognizing adhesive matrix molecule  
adhesin of kollagen from enterococci  
NAA: Nükleik asit amplifikasyon  
NAAB: Nükleik asit amplifikasyonu bazlı  
NNIS: The national nosocomial infection surveillance system  
ORF: Open reading frame  
PBP5: Penisilin bağlayan protein  
PCR: Polymerase chain reaction  
PEA: Phenylethyl alkol agar  
PFGE: Pulsed field gel electrophoresis  
PGE-2: Prostoglandin E2  
PI: Patojenite adası  
PMNL: Polimorfonükleer lökosit  
PYR: Pyrolydonil b-naftilamid  
PYRase: Pyrolidonil arylamidase  
RAPD: Random amplification of polymorphic DNA  
RCR: Rolling circle replicating plasmid  
RE: Restriksiyon endonükleaz  
REA: Restriksiyon enzim analizi  
Rep-PCR: Repetitif PCR  
RFLP: Restriksiyon fragment length polimorfizm  
SDS-PAGE: Sodium dodesil sülfat poli-akrilamid jel elektroforezi  
TBE: Tris-borik asit EDTA  
TIGR: The institute for genomic research  
TGGE: Temporal temperature gradient gel elektroforezi  
TLR: Toll like receptor

TLR-MYD88: Myeloid differentiation factor 88

TNF- $\alpha$ : Tumor nekrotizan faktör-alfa

VDE: Vankomisin bağımlı enterokoklar

VRE: Vankomisin rezistant enterokok

## 1. GİRİŞ

Enfeksiyöz hastalıklar, insanlığın varoluşundan bu yana bütün toplumları etkileyen en önemli sorunlardan biri olmuştur. Enfeksiyöz hastalıkların kaynağı olan mikroorganizmalara karşı eski çağlardan beri çok çeşitli organik ve inorganik kimyasallar, tüsüler ve boyalar kullanılmıştır. Penisilinin keşfinden sonra antibiyotik çağı başlamış ve takip eden yıllarda birçok doğal, sentetik ve semisentetik antimikrobiyal özelliğe sahip ajan üretilerek enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bu antimikrobiyallerle enfeksiyöz hastalıklarının çoğu tedavi edilebilmişken; antibiyotiklerin aşırı ve hatalı kullanımı sonucu yeni bulunan her antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç gelişmiş ve 1900'lü yılların son çeyreğinde *A.baumannii*, *S.maltophilia*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* ve enterokoklar gibi hastane florasına hakim olan ve hastane enfeksiyonlarından sık izole edilen bu major patojenlerin klinik izolatları arasında düşük oranda çoklu ilaç direnci (ÇİD) gösteren suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır (Spelman, 2002; Daniella ve ark., 2005; Garcia-Migura ve ark., 2005 Singh ve ark., 2006; Çöleri ve Çökmüş, 2008). Önceleri hastanelerde ortaya çıkan ÇİD gösteren suşlar daha sonra topluma ve çevreye yayılmaya başlamış ve sonuç olarak bu yeni suşlar klasik antibiyotik tedavisine cevap vermeyen hastalıkların ve yüksek morbidite/mortalitenin sebebi haline gelmişlerdir (Lewis ve Zervos, 1990; Çetinkaya ve ark., 2000; Hayes ve ark., 2003).

İnsan ve hayvanlarda intestinal floranın üyesi olan enterokoklar uzun zaman düşük virulanslı patojenler olarak değerlendirilmişlerdir. Hastanelerde ve hayvanlarda, yoğun ve hatalı antibiyotik kullanımı sonucu başta  $\beta$ -laktam ve aminoglikozid grubu olmak üzere glikopeptit türevi antibiyotiklere karşı direnç geliştiren enterokoklar, hasta veya sağlıklı insan ve hayvanlarda barsak florasını ve anatomik yapılarını bozan diğer faktörlerin de yardımı ile barsak lümeninden lamina propria'ya transloke olarak genel dolaşıma karışıp endojen kökenli bakteriyemi ve endokardite, kontamine materyal ile temas sonuç da diğer insan ve hayvanlarda ekzojen kökenli enfeksiyonlara yol açarak morbidite ve mortalitenin en önemli sebebi haline gelmişlerdir (Daniella ve ark., 2005; Frye ve Jackson, 2013). Günümüzde vankomisin ve/veya teikoplanin dirençli enterokoklar; genel olarak hastane enfeksiyonlarının dördüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarının ikinci, dolaşım sistemi enfeksiyonlarının ise üçüncü sıklıkta

görülen patojenleri olarak gösterilmektedir (Hayes ve ark., 2003; Alp ve Şardan, 2008). Enterokoklar Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık olarak yaklaşık %12'lik bir oranla, stafilokoklardan sonra, en çok nozokominal enfeksiyona neden olan ikinci etken olarak tanımlanmıştır. *E. faecalis*, *E. durans* ve *E. hirae* türleri kanatlılarda pulmonar hipertansiyon sendromu, amiloid eklem bozuklukları, bakteriyemi, ensefalomalazi, nörolojik bozukluklar ve endokarditis ile ilişkili enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiştir (McNamee ve King, 1996; Tankson ve ark., 2001; Steentjes ve ark., 2002; Frye ve Jackson, 2013)

Amerika kıtasında VRE (vankomisin dirençli enterokok) oranı, sağlık merkezlerinde %33, Avrupa ve Kuzey Amerika'da ise %13-28 arasında değiştiği belirlenmiştir (Hidron ve ark., 2008). VR *E. faecium* suşlarının insidansı ABD'de %20-40, İtalya'da %24, Fransa'da %0,8 ve bazı Avrupa ülkelerinde de %10'un üzerinde olduğu bildirilmiştir (Frye ve Jackson, 2013). 2007'de Avrupa'da en yüksek VRE prevalansı Yunanistan ve Portekiz'de %45 bulunmuştur (Stampone ve ark., 2005; Abele-Horn ve ark., 2006; Werner ve ark., 2008). Kanatlı hayvanlarda, Japonya (Yoshimura ve ark., 2000), İtalya (Busani ve ark., 2004), ABD (Hayes ve ark., 2003), Hollanda (Van den Bogaard ve ark., 2002), İskandinavya, İspanya ve İtalya'da (De Jong ve ark., 2009) *E. faecium* en baskın tür olarak bulunmuşken, Malezya (Radu ve ark., 2001), ABD (Molitoris ve ark., 1986; Joseph ve ark., 2001; Hayes ve ark., 2004), Belçika (Butaye ve ark., 2001), İngiltere (Kaukas ve ark., 1986), Danimarka (Aarestrup ve ark., 2000) ve Brezilya'da (Fracalanza ve ark., 2007) *E. faecalis* türünün baskın olduğu rapor edilmiştir.

Hastane kökenli VRE enfeksiyonlarının insidansındaki artış oranı, hastanın endojen florasında yer alan antibiyotiklere dirençli VRE'lerin, hastane şartlarında kullanılan dezenfektanlar ile ortamın nem, ısı ve kuruluğu gibi invitro şartlarına karşı da direnç geliştirerek, hastanede doğal veya kazanılmış immun sistemleri çeşitli sebeplerle baskılanmış hastalar arasında kolaylıkla yayılmasına bağlanmaktadır (Garcia-Migura ve ark., 2005; Chou ve ark., 2008). Bu sebeple VRE'lere bağlı hastane enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesinde ve kontrolünde, intestinal florasında VRE kolonizasyonu olan yatan hastaların erken tespiti ve hastane enfeksiyonu salgını ile ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir.

Hayvanlarda gastrointestinal sistem mikroflorasının büyük bir kısmını oluşturan enterokok türleri, sıklıkla insanlarda mortalite ve morbidite ile ilişkili problemlere sebep olmaktadır (Borgen ve ark., 2001; Doğru ve ark., 2010b). Bu enterokoklar çevresel strese adapte olabilen özel dirençli bakterilerdir. Böylece probiyotik formülasyonu içerisinde yer almaları, et ve süt gibi ürünlerde bulunmaları antibiyotik direncinin sağlamış olduğu bir sonuç olarak değerlendirilmektedir (Hayes ve ark., 2003). Enterokoklar, probiyotik olarak gıda ürünlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Enterokok cinsi içerisinde yer alan *E. faecium* ve *E. faecalis* gıda endüstrisi ve özellikle de süt endüstrisinde kullanılan en önemli türlerdir. Buna karşın, günümüzde enterokok türlerinin gıda üretiminde starter kültür ve/veya probiyotik olarak kullanılmalarına bazı bilim insanları sıcak bakmamaktadır. Enterokoklar genellikle güvenli kabul edilen (GRAS - Generally Recognized As Safe) mikroorganizmalar statüsünde değildirler. Gıda yoluyla alınan antibiyotik direnci olan suşların, insan barsak florasında bulunan diğer bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına yol açabileceği düşünülmektedir. Genellikle gıda kaynaklı VRE'ler, hastane kaynaklı VRE izolatlarından daha düşük oranda virulans faktörü taşırlar. Gıda kaynaklı enterokokların henüz direkt klinik enfeksiyonlara yol açtığı rapor edilmemiştir. Hayvansal gıdaların (hayvan rezervuarlarında), insanlara VRE geçişinde en önemli rolü oynadığı ileri sürülmektedir (Chadwick ve ark., 1996; Kirk ve ark., 1997; Wegener ve ark., 1997; Klein ve ark., 1998; Quednau ve ark., 1998; Van Den Braak ve ark., 1998; Borgen ve ark., 2001; Doğru ve ark., 2010a).

VRE'lere bağlı hastane enfeksiyonlarında salgın suşları arasındaki ilişkinin tespitinde önceleri biyokimyasal özellikler, antibiyotik direnci, western blotting ve multilokus enzim elektroforezi (MLEE) gibi fenotipik özelliklere dayalı epidemiyolojik izlem yöntemleri kullanılmıştır. Ancak bu yöntemler, düşük tekrarlanabilirlik ve ayırım güçleri, pahalı ve zaman alıcı yöntemler olmaları gibi dezavantajları sebebi ile yerlerini daha yüksek ayırım gücüne sahip yüksek tekrarlanabilirlik özelliği gösteren moleküler epidemiyolojik izlem yöntemlerine bırakmışlardır. VRE kökenli insan ve hayvan enfeksiyonlarında, salgın suşları arasındaki ilişkinin tespitinde moleküler tiplendirme yöntemleri gibi genotipe dayalı yöntemler sık kullanılmıştır (Duim ve ark., 1999; Perandin ve ark., 2001; Struelens ve ark., 2001; Jones ve ark., 2003; Struelens ve ark., 2004).

Bu alışmada, Van ili ve çevresindeki kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmelerdeki tavuklarda ve Van Gölü Havzasında serbest olarak yaşayan martılarda enterokok türlerinin varlığının/yaygınlığının belirlenmesi ile izolatların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri açısından fenotipik ve genotipik analizinin yapılması amaçlandı. Çalışma kapsamında tavuk ve martılardan izole edilen enterokok türleri fenotipik olarak antibiyotik dirençlilik patternleri ve vankomisine direnç genleri açısından genotipik olarak araştırıldı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Enterokok cinsine ait mikroorganizmalar ilk olarak streptokoklar içerisinde “fokal orijinli streptokoklar” olarak gruplandırılmıştır. Enterokok terimi, ilk kez 1899 yılında Thiercelin tarafından Fransa’da yayımlanan bir makalede “insan gaitasında kısa zincirler veya çiftler halinde görülen bakterileri” tanımlamak için kullanılmıştır (Facklam ve Teixeira, 1998). Aynı yılda MacCallum ve Hastings akut endokarditli bir hastada “*Micrococcus zymogenes*” denilen dirençli bir bakteri tanımlamışlardır (Maccallum ve Hastings, 1899). Birkaç yıl sonra Gordon adlı araştırmacı (1905) muhtemelen hayvan gaitası ile havadan kontamine olmuş sıvı besiyerinde fokal streptokok izole ettiğini bildirmiştir (Gordon, 1905). Bununla paralel olarak Houston adlı araştırmacı da (1899) lağım suyunda bol miktarda streptokok bulunduğunu bildirmiş ve suların insan gaitası ile kontaminasyonunu göstermede yararlı olabileceğini ileri sürmüştür (Houston, 1899). *S. faecalis* tür ismi ilk olarak Andrews ve Horder (1906) tarafından, mannitolü ve laktozu fermente eden ancak rafinozu fermente etmeyen ve sütün kesilmesine yol açan gaita kökenli organizmaları tanımlamak için kullanılmıştır (Andrews ve Horder, 1906; Facklam ve Teixeira, 1998; Doğru ve ark., 2010b).

Orla-Jensen adlı araştırmacı (1919) bu grupta fermentasyon özellikleri *S. faecalis*’ten farklılık gösteren *S. faecium* denilen ikinci bir organizma tanımlamış (Kandler ve ark., 1968; Doğru ve ark., 2010b). Sherman (1935) ve Wing (1937) adlı araştırmacılar tarafından *S. faecium*’a benzeyen ancak daha az fermentasyon özelliği gösteren üçüncü bir tür olan *S. durans* tanımlanmıştır. Sherman, 1937 ve 1938 yıllarında, 9,6 pH’da, 10-45°C arasındaki sıcaklıklarda ve %6,5 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreyebilen ve 60°C’de yarım saat canlılığını sürdürebilen streptokoklar için “Enterokokal grup” terimini kullanmıştır (Graham ve Bartley, 1939). Nowlan ve Deibel adlı araştırmacılar (1967) bu gruba *S. avium*’u eklemiştir. Kalina adlı araştırmacı (1970) enterokokal streptokoklar için bir cins oluşturulmasını ve hücresel dizilim ve fenotipik özelliklerine göre *S. faecalis* ve *S. faecium*’un *Enterococcus* olarak isimlendirilmesini önermiştir. Bu öneri fazla dikkate alınmamış ve uzun bir süre Enterokoklar, Lancefiel

sınıflamasına göre serolojik olarak Grup D Streptokoklar olarak *Streptococcus* cinsi içerisinde kalmıştır (Facklam ve Teixeira, 1998; Doğru ve ark., 2010b)

Daha sonra, Schleifer ve Klipper-Baltz adlı araştırmacılar (1984) *S. faecalis* ve *S. faecium* türlerinin diğer streptokoklardan farklı olduklarını ileri sürerek bunların *Streptococcus* cinsinden ayrılıp *Enterococcus* adı altında cinsi olarak tanımlanması gerektiğin söylemişlerdir. Daha sonra DNA-DNA reasosiyasyon çalışmaları, 16S rRNA dizi analizi ve total hücre protein profil analizi ile enterokokların yeni bir cins oldukları gösterilmiştir (Tablo 1). Bu yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda enterokok cinsi içerisinde en az 35 tür tanımlanmıştır. Enterokoklar çeşitli antibiyotiklere doğal dirençli olmaları ve yeni direnç geliştirme yeteneklerinden dolayı son yıllarda hastane enfeksiyonu etkenleri açısından da önem kazanmıştır. Ama klinik olarak en önemli iki patojen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olarak bildirilmiştir. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80'inde bu iki mikroorganizmanın sorumlu olduğu saptanmış olup *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* ve *E. mundtii*'nin de daha az sıklıkla insanlarda enfeksiyonlara neden olduğu belirlenmiştir (Bilström, 2008; Doğru ve ark., 2010b).

## 2.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar, Gram pozitif ve katalaz negatif koklar olup, ekosistem içinde memeliler, kuşlar, reptiller, insektler, toprakta, suda ve atık sularda, bitkilerde, gıdalarda, hayvanların ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında yer alırlar (Borgen ve ark., 2001; Lukasova ve Sustakova, 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Doğru ve ark., 2010b). Enterokok türleri ve *Escherchia coli* insan ve hayvan gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunurlar. Bu mikroorganizmalar, insan ve hayvanlarda antibiyotik direncinin gelişmesinde rol oynayan önemli 'indikatör bakteriler' olarak kabul edilirler (Santos ve ark., 2013). Bu sebeple içme ve kullanma sularındaki fekal kontaminasyonun gösterilmesi için indikatör mikroorganizma olarak kullanılırlar. İnsan dışkısında *E. faecalis* ( $10^5$ - $10^7$  cfu/gr), *E. faecium*'dan ( $10^4$ - $10^5$  cfu/gr) daha yaygın bulunur, fakat özellikle hastane ortamında *E. faecium* daha baskındır. Enterokoklar vajina, deri, oral kavite ve dental plaklarda daha az sıklıkta bulunmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009; Hijazi ve ark., 2009).

Enterokoklar probiyotik olarak gıda ürünlerinde geniş kullanım alanına sahiptir. Enterokok cinsi içerisinde yer alan *E. faecalis* ve *E. faecium* gıda endüstrisinde ve özellikle de süt endüstrisinde kullanılan en önemli türlerdir (Doğru ve ark., 2010b). Bunların dışında enterokoklar laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında başlatıcı olarak da kullanılır. Peynirlerde, et ürünleri ve diğer yiyeceklerden izole edilebilirler (Facklam ve Teixeira, 1998; Charles ve ark., 2001; Bilström, 2008). Ancak günümüzde bilim insanları Enterokok türlerinin gıda üretiminde starter kültür veya probiyotik olarak kullanılmalarına bazı bilim insanları sıcak bakmamaktadır. Enterokoklar genellikle güvenli kabul edilen (GRSA - Generally Recognized As Safe) mikroorganizmalar statüsünde değildirler. Gıda yoluyla alınan antibiyotik direnci olan suşların, insan barsak florasında bulunan diğer bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına yol açabileceği düşünülmektedir (Doğru ve ark., 2010b).

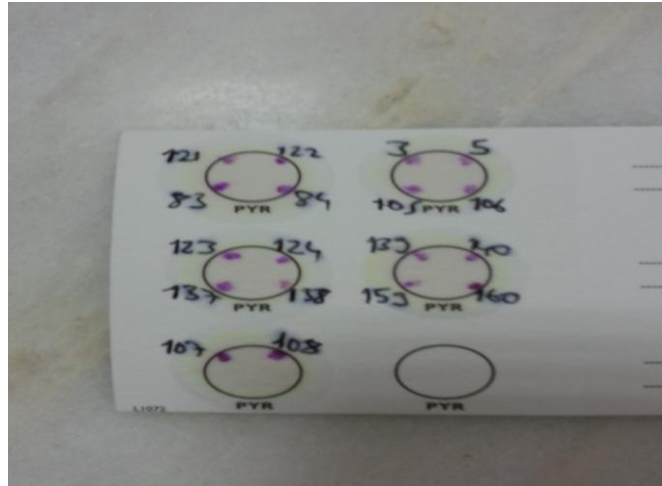
#### **2.2.1. Görünüm ve boyanma özellikleri**

Enterokoklar 0,5-1 µm çapında, tek tek, diplokoklar veya kısa zincirler şeklinde görülebilen, yuvarlak, oval veya kokobasil şeklindeki bakterilerdir. Katı besiyerinde üretilen bakteriler kok veya kokobasiller şeklinde görülürken, sıvı besiyerlerinde üretilen enterokokların daha uzun zincirler oluşturdukları gözlenir. Anilin boya ile kolay boyanırlar ve Gram pozitiflerdir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* hariç, çoğu hareketsizdir (Facklam ve Teixeira, 1998).

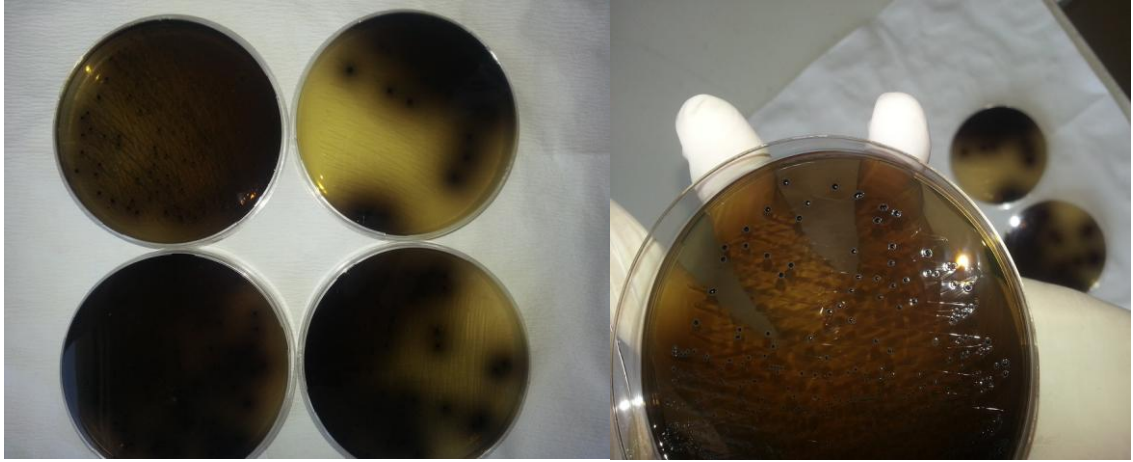
#### **2.2.2. Üreme özellikleri ve fizyolojik karakterleri**

Enterokoklar fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısıları 35°C (10-45°C), optimal üreme pH'ları da 7.2 ± 0.2 dir. Koyun kanlı besiyerinde 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 1-2 mm çapta, streptokoklardan daha büyük, kabarık, gri beyaz renkli S tipi koloniler oluştururlar. *E. faecalis*'lerin 1/3'ü tavşan, insan ve at kanı içeren agarda β-hemoliz oluşturabilir ancak koyun kanlı agarda hemoliz yapmazlar (Facklam ve Teixeira, 1998; Winn ve ark., 2006; Fisher ve Phillips, 2009). Ancak bazı *E. durans* türleri bütün kanlı agarlarda β-hemoliz oluştururlar. Diğer türlerin tamamı genellikle α-hemolitik veya nonhemolitikdir. α-hemolitik görünen suşlar gerçekte peroksit üreten nonhemolitik suşlardır. Besiyerindeki yeşil renk α-toksin

üretimi ile değil, eritrositlerde peroksitin etkisi ile oluşmaktadır. *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* ve *E. sulfureus* kanlı agarda sarı pigment oluşturur. Yüksek ısının yanı sıra yüksek oranda tuz ve safra tuzlarını tolere ederler ve %6,5 NaCl ile %40 safra tuzu varlığında üremeye devam ederler. Eskulini hidrolize eder, bile-esculine (BE) agarda rahatlıkla ürerler. *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* ve *E. saccharolyticus* hariç pek çok enterokok türü, pyrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek pyrolydonil b-naftilamid'e (PYR)'i hidrolize ederler (Şekil 1). Bütün suşlarda leucine aminopeptidase (LAPase) aktivitesi görülür ve leucine  $\beta$ -naphthylamide'i hidrolize ederler. Gram negatif bakterileri de içeren karışık örneklerden izole edilmeleri için selektif besiyeri olarak azid içeren safra-eskulin azid agar veya enterococose agar, columbia kolistin nalidiksik asit agar (CNA) veya fenil etil alkol agar (PEA) kullanılabilir (Winn ve ark., 2006). Selektif besiyerlerinin içerdikleri kimyasal maddelere bağlı olarak koloni rengi değişebilir. Örneğin bile eskulin azid agar gibi eskulin içeren agarda koloniler siyah halo ile çevrelenmiş, gri-beyaz koloniler olarak görülebilirken; tetrazolium tuzları içeren agarda kolonilerin ortasında tuğla kırmızısı renk oluşur (Şekil 2) (Facklam ve Teixeira, 1998).



Şekil 1. Enterokokların PYR test görüntüsü (mor renk pozitif)



Şekil 2. Enterokokların Bile Eskulin Agar (BEA) görüntüleri

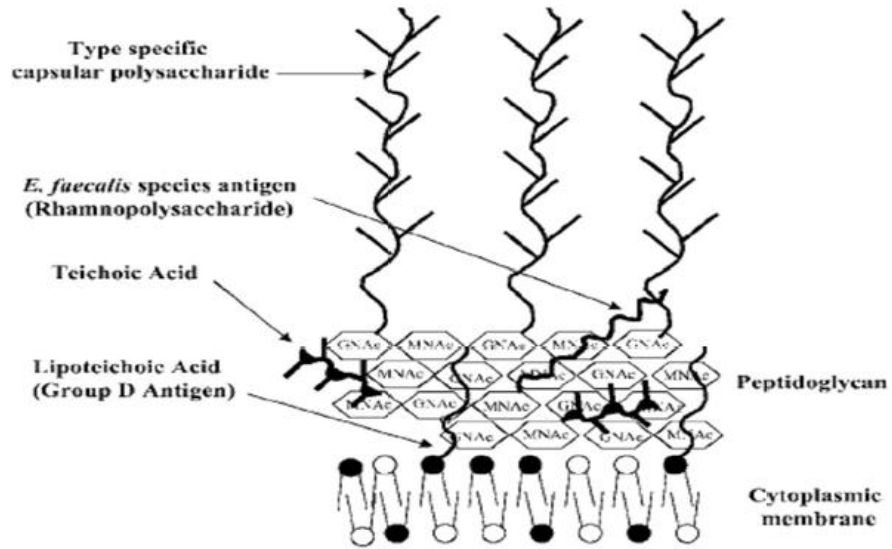
Enterokokların karbon metabolizması, solunum, iyon transportu, pirimidin ve folat yolları, stres cevapları ve reaktif oksijen türleri metabolizmaları dikkat çekicidir. Enterokokların bazal metabolik faaliyetleri için B1, B6 ve B12 vitaminlerine, nükleik asit bazları ve bir karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. *E. faecalis*'in çoğalması için histidin izolösin, metionin ve triptofan gerekli iken, diğer bazı türler arginin, glutamat, glisin, lösin ve valin'e ihtiyaç duyarlar (Murray ve ark., 1993; Facklam ve Teixeira, 1998). Ancak bazı türler de bu aminoasitlere ihtiyaç duyulmaz. Vankomisin bağımlı suşlarda olduğu gibi yoğun antimikrobiyal baskı, metabolik ihtiyaçları etkileyebilir. Bu da farklı enterokokların türlerinin metabolik ihtiyaçlarının suştan suşa bile farklılık gösterdiği anlamına gelmektedir (Facklam ve Teixeira, 1998; Akçimen, 2010).

Enterokoklar hem respiratif tip hem de fermentatif tipte metabolizmaya sahiptir. Enterokoklar porfirin prekürsörleri sentezleyemez ve bu yüzden sitokrom enzimleri eksprese olmaz ve katalaz negatiftir (Frankenberg ve ark., 2002; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Bazı *E. faecalis*'ler kanlı besiyerinde üretildiğinde sitokrom aktivitesi gösterebilir ve zayıf olarak katalaz pozitifliğine yol açabilir. Ayrıca *E. haemoperoxidus* türlerinde de katalaz pozitifliği bildirilmiştir. Bütün suşlar homofermentiftir, gaz oluşturmazlar ve glukoz fermentasyonun son ürünü laktik asittir (Svec ve ark., 2001; Akçimen, 2010).

### 2.2.3. Hücre duvarı yapısı ve antijenik özellikleri

Enterokokların hücre duvarının üç bileşeni peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Hücre duvarının %40'ı peptidoglikandan oluşur, geri kalan kısım ise ramnoz içeren polisakkarit ve ribitol içeren teikoik asittir. Peptidoglikan polimerleri glikan zincirler ve bunlara bağlanmış kısa peptitler L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala'dan oluşur. Komşu peptitler, pentapeptid yan zincirler ile çapraz bağlanırlar. Peptidoglikan dışı yardımcı polimerlerin yapısal bileşimi kesin olarak bilinmemektedir (Facklam ve Teixeira, 1998; Akçimen, 2010).

Lancefield'in serolojik tiplendirmesinde; streptokokların çoğunun, baskın olan hücre duvarı karbonhidratlarına göre sınıflanmasına karşın, enterokokların yer aldığı "D" grubunda serolojik tiplendirme lipoteikoik asitlerin (LTA) antijenik özelliklerine göre yapılır. Gruba özelliğini veren "D" antijeni, gliserol ünitelerine bağlanmış yüksek oranda glukoz içeren poligliserolfosfatın teikoik asit polimeridir. LTA'nın lipit kısmı 1-kolibiosyl digliseriddir. Bu glikolipit membranın bir parçası olarak bulunur. Streptokokal grup-D antijenleri enterokok türleri ile *S. bovis* kompleks, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus*'larda bulunmaktadır (Şekil 3) (Fisher ve Phillips, 2009; Akçimen, 2010).



Şekil 3. *E. faecalis* hücre duvarındaki polimerlerin şematik görüntüsü (Akçimen, 2010)

#### 2.2.4. Sınıflandırma ve identifikasyon

Schleifer ve Kilpper-Balz (1984) tarafından *Enterococcus* cinsinin kabulünden sonra, streptokoklardan ayrılan enterokoklar içerisinde *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri dahil edilmişken, günümüzde enterococcus cinsinde en az 35 farklı tür tanımlanmıştır (Tablo 2). Fenotipik farklılıkların yanı sıra 16S rRNA gen dizi analizi yöntemi ile yapılan katalaz negatif Gram pozitif kok cinslerinin filogenetik analizi sonuçlarına göre enterokoklar, streptokoklar ve laktokoklar'dan çok *Vagococcus*, *Tetragenococcus* ve *Carnobacterium* cinsleri ile daha yakın ilişkili bulunmuştur. Önceleri, katalaz negatif, Gram pozitif koklardan; BE besiyerinde üreyebilen, PYR ve LAP testi pozitif olan, %6,5 NaCl'ü ve 45°C'yi tölere eden suşlar enterokok olarak tanımlanmıştır. Enterokoklar bu sınıflandırma ile kendilerine çok benzerlik gösteren *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Vagococcus*'dan sadece BE reaksiyonu ve %6,5 NaCl içeren besiyerinde üreme yetenekleri ile ayırt edilebilmiş, ancak sıklıkla hatalı sonuçlar alınarak sınıflandırmada yanlışlıklar yapılmıştır. Diğer taraftan enterokokların %80'inde tespit edilebilen Grup-D antijenininde taksonomi için yetersiz olduğu görülmüştür. Ayrıca *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve bazı *Vagococcus*'larda grup-D antijeni taşıyabilir. Yine GenProbe tarafından üretilen AccuProbe *Enterococcus* genetik prob, enterokokal rRNA segmentine komplementerdir ve enterokok tanımlanmasında kullanılabilir. Ancak *Vagococcus*'larda bu prob ile reaksiyon verebilir (Facklam ve Teixeira, 1998; Fisher ve Phillips, 2009; Doğru ve ark., 2010b).

**Tablo 1.** Enterokokların sınıflandırılması

|          |                     |
|----------|---------------------|
| Kingdom  | Bacteria            |
| Division | Firmicutes          |
| Class    | Bacilli             |
| Order    | Lactobacillales     |
| Family   | Enterococcaceae     |
| Genus    | <i>Enterococcus</i> |

**Tablo 2.** *Enterococcus* cinsi içerisinde yer alan türler

|                                   |                                    |                                     |
|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Enterococcus aquimarinus</i>   | <i>Enterococcus faecalis</i>       | <i>Enterococcus pallens</i>         |
| <i>Enterococcus asini</i>         | <i>Enterococcus faecium</i>        | <i>Enterococcus phoeniculicola</i>  |
| <i>Enterococcus avium</i>         | <i>Enterococcus gallinarum</i>     | <i>Enterococcus pseudoavium</i>     |
| <i>Enterococcus caccae</i>        | <i>Enterococcus gilvus</i>         | <i>Enterococcus raffinosus</i>      |
| <i>Enterococcus canintesi</i>     | <i>Enterococcus haemoperoxidus</i> | <i>Enterococcus ratti</i>           |
| <i>Enterococcus canis</i>         | <i>Enterococcus hermanniensis</i>  | <i>Enterococcus saccharolyticus</i> |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | <i>Enterococcus hirae</i>          | <i>Enterococcus silesiacus</i>      |
| <i>Enterococcus cecorum</i>       | <i>Enterococcus italicus</i>       | <i>Enterococcus sulfurens</i>       |
| <i>Enterococcus columbae</i>      | <i>Enterococcus malodoratus</i>    | <i>Enterococcus termitis</i>        |
| <i>Enterococcus devriesei</i>     | <i>Enterococcus moraviensis</i>    | <i>Enterococcus thailandicus</i>    |
| <i>Enterococcus dispar</i>        | <i>Enterococcus mundtii</i>        | <i>Enterococcus villorum</i>        |
| <i>Enterococcus durans</i>        |                                    |                                     |

Geleneksel testler ile tanımlama hızlı değildir. Enterokoklar mannitol, sorbitol ve sorboz içeren besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş gruba ayrılırlar (Tablo 3, Şekil 4) (Facklam ve Teixeira, 1998; Akçimen, 2010).

**Grup 1:** *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. pallens*, *E. gilvus*'dan oluşur. Bu türler mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit oluşturur, ancak arginini hidrolize etmezler.

**Grup 2:** *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E. mundtii* ve *E. gallinarum*'dan oluşur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize ederler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

**Grup 3:** *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti* ve *E. faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantları bu grubu oluşturur. Bu gruptaki türler D antijeni içermez, arginini hidrolize ederler, fakat mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmazlar.

**Grup 4:** *E. sulfurens*, *E. asini*, *E. phoeniculicola* ve *E. cecorum* bu grupta bulunmaktadır. Bu gruptaki türler mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfureus* asit oluşturmaz.

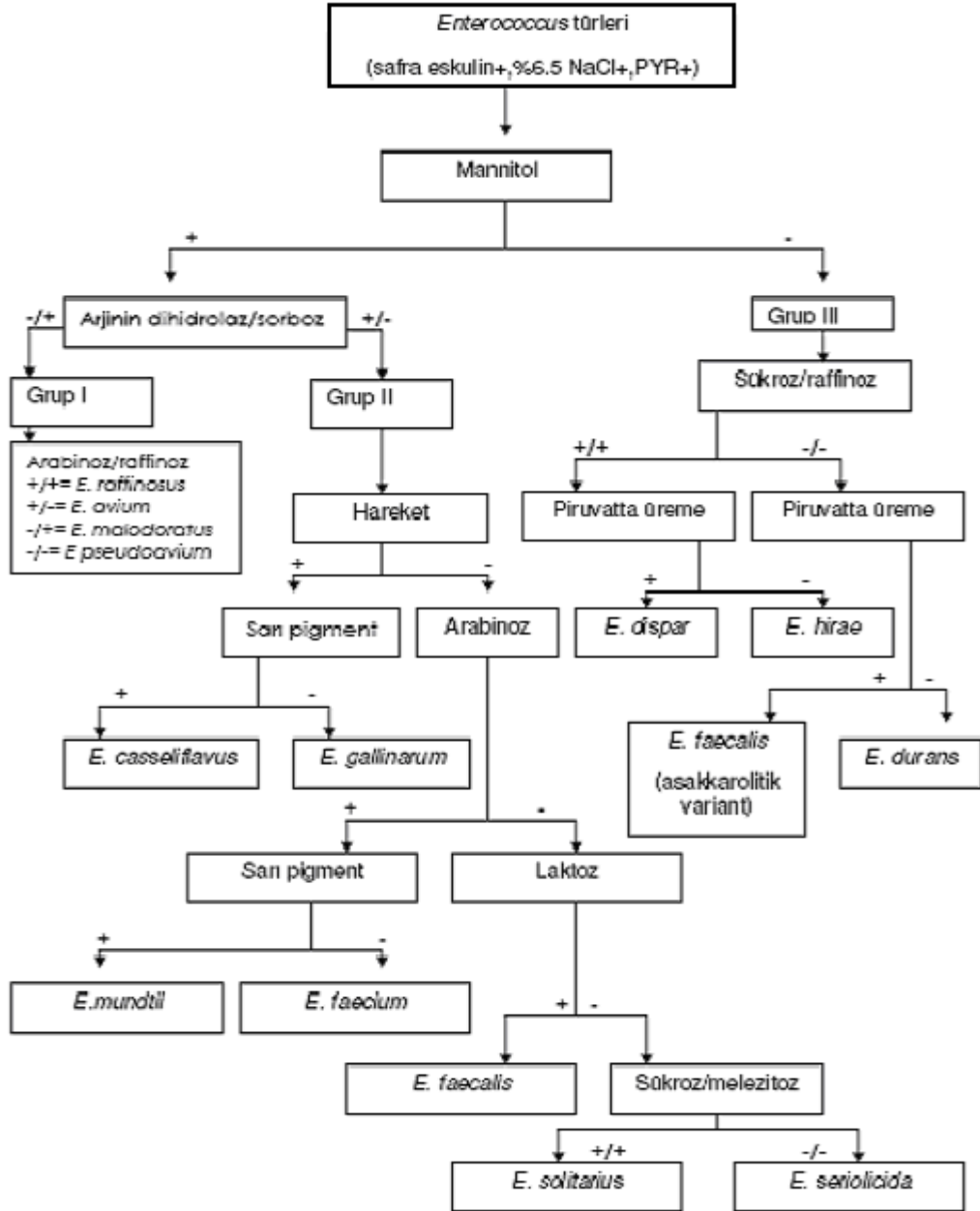
**Grup 5:** *E. columbae*, *E. canis*, *E. moraviensis* bu grupta bulunur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

**Tablo 3:** Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri (Akçimen, 2010)

| Grup, Tür                 | Grup D Antijen | Safra eskulin üreme | %6,5 NaCl'de üreme | 10°C'de 45°C'de |       | Asit Üretimi |     |         |              |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |
|---------------------------|----------------|---------------------|--------------------|-----------------|-------|--------------|-----|---------|--------------|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|
|                           |                |                     |                    | üreme           | üreme | LAP          | PYR | Hareket | Sarı pigment | ADH | HIP | GLU | MNTL | SORB | ARB | SBTL | RAF | SUK | PRV | MPG |
| <b>Grup I</b>             |                |                     |                    |                 |       |              |     |         |              |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |
| <i>E. avium</i>           | +              | +                   | +                  |                 | +     | +            | +   | -       | -            | -   | D   | +   | +    | +    | +   | +    | -   | +   | +   | D   |
| <i>E. gilvus</i>          | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | +            | -   | -   | +   | +    | +    | +   | -    | +   | +   | +   | -   |
| <i>E. malodoratus</i>     | +              |                     | +                  |                 | -     | +            | +   | -       | -            | -   | D   | +   | +    | +    | -   | +    | +   | +   | +   | D   |
| <i>E. pallens</i>         | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | -   | -       | +            | -   | +   | +   | +    | +    | +   | +    | +   | +   | +   | -   |
| <i>E. pseudoavium</i>     | -              | +                   | -                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | -   | +   | +   | +    | +    | +   | -    | +   | -   | +   | +   |
| <i>E. raffinosus</i>      | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | -   | -   | +   | +    | +    | +   | +    | +   | +   | +   | D   |
| <i>E. saccharolyticus</i> | -              |                     | +                  |                 |       | +            | -   | -       | -            | -   | -   | +   | +    | +    | -   | +    | +   | +   | -   | +   |
| <i>Enterococcus sp</i>    | -              | -                   | +                  | +               | -     | +            | -   | -       | -            | -   | -   | +   | +    | +    | +   | -    | +   | -   | +   | -   |
| <b>Grup II</b>            |                |                     |                    |                 |       |              |     |         |              |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |
| <i>E. faecalis</i>        | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | +   | +   | +   | +    | -    | -   | +    | -   | +   | +   | -   |
| <i>E. faecium</i>         | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | +   | -   | +   | +    | -    | +   | D    | D   | +   | -   | -   |
| <i>E. casseliflavus</i>   | +              | +                   | +                  |                 | +     | +            | +   | +       | +            | +   | -   | +   | +    | -    | +   | D    | +   | +   | D   | +   |
| <i>E. gallinarum</i>      | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | +       | -            | +   | +   | +   | +    | -    | +   | -    | +   | +   | -   | +   |
| <i>E. mundtii</i>         | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | +            | +   | -   | +   | +    | -    | +   | D    | +   | +   | -   | -   |
| <i>E. haemolyticus</i>    | +              | +                   | +                  | +               | -     | +            | +   | -       | +            | +   | +   | +   | +    | -    | -   | -    | -   | +   | -   | +   |
| <i>Enterococcus sp</i>    | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | +   | -   | +   | +    | -    | -   | -    | -   | +   | -   | -   |
| <b>Grup III</b>           |                |                     |                    |                 |       |              |     |         |              |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |
| <i>E. dispar</i>          | -              | +                   | +                  | +               | -     | +            | +   | -       | -            | +   | D   | +   | -    | -    | -   | -    | +   | +   | +   | +   |
| <i>E. durans</i>          | +              | +                   | +                  |                 | +     | +            | +   | -       | -            | +   | D   | +   | -    | -    | -   | -    | -   | -   | -   | -   |
| <i>E. hirae</i>           | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | +   | -   | +   | -    | -    | -   | -    | +   | +   | -   | -   |
| <i>E. ratti</i>           | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | +   | D   | +   | -    | -    | -   | -    | -   | -   | -   | -   |
| <i>E. villorum</i>        | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | +   | -   | +   | -    | -    | -   | -    | -   | -   | -   | -   |
| <b>Grup IV</b>            |                |                     |                    |                 |       |              |     |         |              |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |
| <i>E. asini</i>           | +              | +                   | -                  | D               | D     | +            | +   | -       | -            | -   | +   | +   | -    | -    | -   | -    | -   | -   | -   | D   |
| <i>E. cecorum</i>         | -              |                     | -                  | -               | +     | +            | -   | -       | -            | -   | -   | +   | -    | -    | -   | +    | +   | +   | +   | -   |
| <i>E. sulfuricus</i>      | -              | +                   | +                  | +               | -     | +            | +   | -       | +            | -   | -   | +   | -    | -    | -   | -    | +   | +   | -   | +   |
| <i>E. phoeniculiicola</i> |                |                     | -                  | -               |       |              |     | -       | -            | -   | -   | +   | -    | -    | -   | -    | -   | +   | +   | +   |
| <i>Enterococcus sp</i>    | +              | +                   | +                  | +               | +     | +            | +   | -       | -            | -   | -   | +   | -    | -    | -   | -    | -   | +   | +   | +   |
| <b>Grup V</b>             |                |                     |                    |                 |       |              |     |         |              |     |     |     |      |      |     |      |     |     |     |     |
| <i>E. columbae</i>        | -              | +                   | +                  |                 |       | +            | -   | -       | -            | -   | -   | +   | +    | -    | +   | +    | +   | +   | +   | -   |
| <i>E. canis</i>           |                | +                   | +                  |                 |       | +            | +   | -       | -            | -   | -   | +   | +    | -    | +   | -    | -   | D   | +   | +   |
| <i>E. moraviensis</i>     | +              | +                   | +                  | +               | -     | +            | D   | -       | -            | -   | +   | +   | +    | -    | +   | -    | -   | +   | +   | +   |

LAP: lüsin aminopeptidaz; PYR: pirolidonil arilamidaz; ADH: arginin dihidrolaz; HIP: hipurat hidrolizi; GLU: glukoz; MNTL: mannitol; SORB:sorboz; ARB: arabinoz; SBTL:sorbitol; RAF: raffinoz; SUK: sukroz; PRV: piruvat; MPG: metil-alfa-D-glukopirazonit; D: değişken

Şekil 4. Enterokok türleri identifikasyon şeması (Akçimen, 2010)



## 2.2.5. Genom özellikleri

ABD’de The Institute for Genomic Research (TIGR) ve Joint Genomic Institute of the Dept of Energy laboratuvarlarında hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen *E. faecalis*, *E. faecalis* V583 ve *E. faecium*, *E. faecium* ATCC BAA-472, suşlarının tam genom dizi analizi yapılmıştır. Enterokokların G+C içeriği %37-45 arasındadır (Tendolkar ve ark., 2003; Upadhyaya ve ark., 2009).

*E. faecalis* V583 genomu, 3.218.031 bp uzunluğunda olup 3182 open reading frame (ORF)'e sahiptir. Genlerin çoğu, türler veya özellikle *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinsleri arasında lateral gen transferi ile kazanılmıştır. VanB fenotipi gösteren ilk VRE suşu olan *E. faecalis* V583 suşunun, genomunun yaklaşık olarak %25'i mobil veya eksojen gen olarak kazanılmış DNA dizilerinden oluşur. Bu mobil elementler konjugatif ve kompozit transpozonlar, patojenite adaları, integre plazmid genleri ve faj bölgeleri ve çok sayıda insersiyon dizilerinden oluşur. Mobil gen elementlerinin kazanımı ilaç direncinin kazanımı ve yayılımına katkıda bulunmaktadır. Bu da enterokokların ilaç direncinde bir rezervuar olduğunun kanıtıdır. *E. faecalis* V583 suşunda kromozomal DNA dışında büyüklükleri 66320 bp, 57660 bp ve 17963 bp olan 3 plazmid bulunur. Plazmidle de sırası ile 72, 64 ve 19 ORF kodlanır. Plazmidlerin G+C oranı %34 civarındadır (Tendolkar ve ark., 2003; Upadhyaya ve ark., 2009; Oravcova ve ark., 2013).

*E. faecium* genomu 2.928.706 bp büyüklüğünde olup, 3309 ORF içerir. Genomda toplam G+C oranı %37,8'dir (Tendolkar ve ark., 2003; Çöleri ve Çökmüş, 2008; Upadhyaya ve ark., 2009; Akçimen, 2010).

#### 2.2.6. Genetik bilgi transferi

*E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında, virulans genleri veya ilaç direnci ile ilgili genetik bilgi transferinde rol oynayan, çok sayıda plazmid, transpozon, patojenite adası, integre plazmid geni ve faj bölgesi ile oldukça fazla sayıda insersiyon dizileri, plazmid ve transpozon bulunmuştur (Handwerger ve ark., 1993; Camargo ve ark., 2004; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

Enterokoklarda rolling circle replicating (RCR) plazmid, Inc18 plazmid ve feromon-responsiv ve plazmid olmak üzere üç sınıf plazmid tanımlanmıştır. RCR ve Inc18 plazmidleri pek çok cinsten replike olabilirken, feromon-responsiv plazmid replikasyonu sadece enterokoklarla özellikle de *E. faecalis* ile sınırlıdır. Plazmid bulunmayan alıcı suşlar ekstraselüler feromon sentezleyerek, verici hücre dış yüzeyinde agregasyon faktör (Af) denilen proteinöz maddenin oluşumunu sağlar. Af alıcı hücrenin yüzeyine bağlanır ve alıcı ile verici hücrenin yakınlaşması sonucu plazmid değişimi

oluşur. Feromon ile indüklenmiş transfer, plazmid geçişini  $10^5$ - $10^6$  kat arttır (Handwerger ve ark., 1993; Facklam ve Teixeira, 1998; Tendolkar ve ark., 2003).

Enterokoklar ayrıca konjugatif transpozonlar ile genetik bilgi değişimi yapabilir. Bunun için hücre teması gereklidir. Transpozonlar sıklıkla tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve diğer aminoglikozidler gibi antimikrobiyal ilaçlara direnç genleri taşırlar. Konjugatif transpozon Tn916, *E. faecalis*'lerde tetrasiklin direncini kodlarken; Tn1546 vankomisin direncini kodlayan *vanA* gen kümesini, Tn1547, Tn1549 ve Tn 5382 VanB operonunu, Tn5281 yüksek düzey gentamisin direncinden sorumlu *AAC(6')-IeAPH(2')* genini taşır. Transpozonlar çok geniş bir konak spektrumuna sahip olup enterokokların yanı sıra streptokoklar, laktokoklar ve diğer Gram pozitif bakterilerde de bulunurlar. Konjugasyon ile ilişkili belirli moleküller, enfeksiyon sırasında immun modülatör rol oynayabildiğinden patojeniteye katkıda bulunurlar (Leclercq ve ark., 1989; Haeton ve ark., 1996; Bozdoğan ve Leclercq, 1999; Akçimen, 2010).

### 2.3. Virulans Faktörleri

Enterokoklar gastrointestinal sistemde kommensal olarak bulunmalarına rağmen, belirli predispozan durumlarda barsak dışı bölgelere yayılarak hastalıklara sebep olurlar. Mikroorganizmanın antibiyotik direnci ve virulansla ilişkili yeni genetik materyal kazanabilme özelliği onu daha virulan yapar ve konakta farklı bölgelere kolonizasyonuna alışılmışın dışında enfeksiyon oluşturmaya yardım eder. Ancak kolay genetik bilgi transferi, mikroorganizmanın virulansından sorumlu tek faktör değildir. Yapılan çok sayıda çalışma ile mikroorganizmaya ait farklı virulans faktörleri bulunmuştur (Song ve ark., 2006; Upadhyaya ve ark., 2009; Trivedi ve ark., 2011).

Mikroorganizmanın virulansı genomda bulunan patojenite adaları (PI) denilen özel bölgelerde ve plazmidlerde kodlanan virulans genleri ile düzenlenmektedir.

Enterokokların patojenite adaları ilk kez 1980 yılında nozokomiyal salgına yol açan ÇİD *E. faecalis*'te tanımlanmıştır. G+C oranı %32,2 büyüklüğü de 150 kb civarında olan bu PI; enterokokal surface protein (*esp*), agregasyon faktör (*asa*) ve

sitolizin (*cyl*) gibi virulans genlerinin yanı sıra transpozonlar, transkripsiyonel regülatörler ve proteinleri kodlayan genlerin yer aldığı 129 ORF bölgesine sahiptir (Shankar ve ark., 2002; Tendolkar ve ark., 2003; Shankar ve ark., 2004; Shankar ve ark., 2006; Çöleri ve Çökmüş, 2008; Upadhyaya ve ark., 2009). Bu PI'nın bulunmasından iki yıl sonra *E. faecium* suşlarında *E. faecalis*'dekinden farklı olan bir PI varlığı bulunmuştur. *E. faecium* klinik izolatlarında “*esp*” geninin görülmesi bu türdeki patojenite adası için bir indikatör olarak kabul edilmiştir (Shankar ve ark., 1999; Leavis ve ark., 2004; Tendolkar ve ark., 2004; Çöleri ve Çökmüş, 2008). Farklı VRE suşlarındaki PI dizilerinin karşılaştırılması sonucu; yüksek derecede dizi benzerlikleri olduğu ve spesifik gen bölgelerin değişen sıklıkta delesyona uğradıkları görülerek, bu mikroorganizmaların virulans düzenleme yeteneği kazandıkları gösterilmiştir. Diğer taraftan bu çalışmalarda PI'larının en az üçte birinin konjugatif bir plazmidin kromozoma integrasyonu ile oluştuğu ispatlanmıştır. Ayrıca PI larda fonksiyonu izah edilemeyen 18 ORF bölgesi kodlanmaktadır. Kommensal enterokokların PI'lerinde bu ORF bölgeleri gösterilememiş, bu sebeple de, bunların enterokokların hastane ortamında yaşamasına, hastalık geçişine veya patogeneze katkıda bulundukları düşünülmüştür (Çöleri ve Çökmüş, 2008; Upadhyaya ve ark., 2009; Akçimen, 2010).

Enterokokların en önemli virulans faktörleri:

1. Hemolizin veya sitolizin,
2. Jelatinaz,
3. Enterokokal surface protein,
4. Agregasyon faktörü,
5. MSCRAMM Ace (Microbial surface komponent recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from Enterococci),
6. Kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri
7. Lipoteikoik asit
8. Süperoksitler
9. Seks feromonları
10. Hyaluronidaz
11. Efa
12. AS-48
13. Antibiyotik direncidir.

### 2.3.1. Hemolizin/Sitolizin

Önceleri hemolizin olarak tanımlanan sitolizin, çeşitli *E. faecalis* izolatlarında bulunabilen, insan, at ve tavşan eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren bir sitotoksik proteindir. Sitolizin eritrositler dışında, polimorfonükleer lökosit (PMNL)'ler, makrofajlar ve Gram pozitif organizmalar içinde litik aktivite gösterir. Buna karşılık toksinin koyun eritrositleri ve Gram negatif bakterilere karşı inaktif olduğu gösterilmiştir. Sitolizin'in aynı zamanda bir bakteriosin olduğu ve litik aktiviteye ek olarak bütün Gram pozitif organizmalar için bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Upadhyaya ve ark., 2009; Radhoani ve ark., 2010). Sitolizin sıklıkla büyük bir feromon-responsif plazmid de, bazen de kromozoma integre olan bir patojenite adasında kodlanabilen bir toksindir (Haas ve ark., 2002; Shankar ve ark., 2004; Doğru ve ark., 2010a). Sitolizin operonu *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, ve *cylI* olarak tanımlanan sekiz gen içerir. Aktif sitolizin subünitleri olan "CylLL" ve "CylLS" ribozomda sentezlenip posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve sonra ekstrasellüler ortama sekrete edilerek aktive olur. "cylR1" ve "cylR2" iki ayrı regülatör gendir ve sitolizin yapısal genlerinin transkripsiyonunu baskırlar (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Cox ve ark., 2005). Sitolizin üretimi için bir quorum-sensing mekanizması olduğu bildirilmiştir. *CylLS* sekresyonunu sağlayan quorum-sensing mekanizması ile sitolizin ekspresyonu indüklenir (Haas ve ark., 2002; Devriese ve ark., 2006). Ayrıca başka bir çalışmada sitolizin yapısal subünitlerini kodlayan *cylLL* ve *cylLS* genlerinin regülasyonunun ortamın oksidasyon redüksiyon (Eh) potansiyeli ile ilişkili olduğu, düşük Eh potansiyeline sahip ortamlarda regülasyonun, yani sitolizin üretiminin arttığı gösterilmiştir. Sitolizin operonu, sitolizin dışında *af* ve *esp* gibi diğer virulans genleri ile de ilişkilidir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Shankar ve ark., 2004; Radhoani ve ark., 2010).

Sitolizin'in enterokokların virulansına ve enterokoksik hastalıkların prognozuna etkileri kesin olarak belirlenememiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada enfeksiyon ile ilişkili materyalden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %60'ının ve gaita izolatlarının ise %17'sinin sitolizin ürettiği bulunmuştur. Ancak benzer amaçlı çok sayıdaki çalışmada ise endokardit, bakteriyemi ve gaita izolatlarında sitolizin üretiminde farklılık bulunamamıştır. Moleküler düzeyli son çalışmalara göre; klinik *E. faecalis* izolatlarında

sessiz bulunan *cyl* geni negatif fenotipik profile yol açarken, enfeksiyon bölgesinde bulunan çevresel faktörler ile bu genlerin aktive olabildiği gösterilmiştir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Radhoani ve ark., 2010).

### 2.3.2. Jelatinaz

Enterokoklar tarafından üretilen jelatinaz, jelatin, kollajen, fibrinojen, kasein, hemoglobin, insülin ve bazı bioaktif peptitleri hidrolize edebilen, matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstra selüler çinko içeren bir üyesidir. Jelatinaz üreten *E. faecalis* suşlarının akut toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve hayvan modellerinde endokardit oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Jelatinaz üretiminin inhibisyonunun doku kültüründe kemik rezorbsiyonunu azalttığı da gösterilmiştir. Ayrıca inflamatuvar hücreler, epitelyal hücreler, fibroblast ve osteoklast gibi memeli hücreleri tarafından da üretilen jelatinaz, ekstra selüler matriksi degrade etmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Radhoani ve ark., 2010).

Enterokoklarda jelatinaz enziminin varlığı ilk kez 1964 te *E. faecalis* suşlarında gösterilmiştir. *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretimini, Stafilokokal accessory gen regülatör lokusu (AGR)'nun bazı bölümlerine benzer dizi içeren “*fsr*” lokusu regüle eder. Farklı klinik materyalden izole edilen *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretim oranlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Genel olarak tüm izolatların yaklaşık olarak %45-68’ inde jelatinaz üretiminden sorumlu olan “*fsr*” gösterilmişken; bir çalışmada bu gen, endokardit izolatlarının %100’ünde, gaita izolatlarının ise %53’ ünde tespit edilmiştir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Upadhyaya ve ark., 2009; Radhoani ve ark., 2010).

### 2.3.3. Enterokokal surface protein (*esp*)

Yüksek moleküler ağırlığa sahip, enterokokal surface proteini (*esp*), 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geninde kodlanır ve konjugasyonla enterokok izolatları arasında aktarılabilir. *Esp*, salgına yol açan *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında bulunduğundan, epidemik suşları gösteren bir marker olduğu düşünülmektedir. *Esp*, bakteriyemi ve endokardit ile ilişkili suşlarda yüksek oranda bulunurken, gaita kökenli izolatlarında nadiren bulunur (Eaton ve Gasson, 2001; Poeta

ve ark., 2006a; Poeta ve ark., 2006b). *Esp*'nin karboksi-terminal ucu ile, üriner sistem enfeksiyonlarında musin veya uroplakin gibi mesane duvarı komponentlerine bağlanarak, bir kolonizasyon faktör gibi *E. faecalis*'in mesane epiteline yapışmasını sağladığı, persistense katkıda bulunduğu ve biyofilm oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Proteinin iç kısmında tekrarlayan birimlerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalma özelliği kazandıran bir bölge bulunmaktadır. Bu yapı varyasyonlarının bakterinin immün cevaptan kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Versteeg, 1997; Shankar ve ark., 1999; Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Tendolkar ve ark., 2004; Upadhyaya ve ark., 2009; Tsikrikonis ve ark., 2012).

#### 2.3.4. Agregasyon faktörü (Af)

Agregasyon faktör (Af), bakteri yüzeyinde yer alan saça benzeyen, protein yapıda bir adhesindir. Hücre-hücre temasını düzenleme, hücre dışı matriks proteinlerine adhezyonla konak hücreye yapışma ve hücre yüzey hidrofobisitesini arttırma gibi özellikleri ile virulansa katkıda bulunan Af, feromon-responsif plazmidde kodlanır. Nötrofil ve makrofajlarla oluşan cevap değişkenlik gösterir; ancak Af'ün konak defansına karşı koruyucu faktör olarak görev yaptığı sonucuna varılabilir. Af'ye sahip olan enterokoklar, kompleman reseptörü yoluyla nötrofillere opsonizasyondan bağımsız olarak bağlanırlar. Bu tür bağlanma nötrofiller tarafından bakterinin öldürülmesini engeller. Makrofajlar tarafından fagositozda ise, reaktif oksijen türleri üretimi ile oksidatif patlama inhibe edilerek, fagositik yıkıma karşı direnç gösterilir. Diğer taraftan Af içeren suşlarla indüklenmiş PMNL'lerde hem ekstraselüler süperoksit üretimi hem de fagozomal oksidan üretimi daha fazla olmaktadır. Bu oksidatif patlama enfeksiyonu sınırlandırmanın yanı sıra enterokoklarla oluşan doku hasarına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca süper antijen aktivitesine sahip olan Af'nin T hücre proliferasyonunu, prolifer T hücrelerden TNF- $\beta$  ve IFN- $\gamma$  ve makrofajlardan da TNF- $\alpha$  salınımını indüklediği gösterilmiştir. Alıcı ve verici bakteriler arasında temasa aracılık eden Af, plazmid transferini kolaylaştırır. Konjugasyon sırasındaki bakterilerin böbrek tübüler hücresine ve barsak epiteline integrinler yoluyla adhezyonuna aracılık eder. Bakterinin kollajen tip1 gibi ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmasını sağlar (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Upadhyaya ve ark., 2009).

### **2.3.5. MSCRAMM Ace (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule adhesin of kollagen from Enterococci)**

Yapısal ve fonksiyonel olarak *S. aureus*'un kollajen bağlayan proteini *Cna*'ya benzer özelliklere sahip olan *MSCRAMM Ace*, hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı sağlayan protein yapıda bir adhezindir. Enterokoksik enfeksiyonlarda, özellikle *E. faecalis* endokarditlerinde *Ace* yaygın olarak eksprese edilir. Klinik izolatlarda fekal izolatlardan daha yüksek oranda bulunmaktadır. Ayrıca bakterinin dentine adhezyonunda da etkilidir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Sillanpa ve ark., 2009; Upadhyaya ve ark., 2009; Akçimen, 2010).

### **2.3.6. Kapsül ve hücre duvarı polisakkaritleri**

Klinik *E. faecalis* izolatlarında yaygın olarak üretilen kapsül polisakkaritini kodlayan bir operon bulunmaktadır. Bunun dışında hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* izolatlarında ikinci bir kapsül polisakkariti daha tanımlanmıştır. Her iki polisakkaride karşı oluşan antikorlar koruyucudur. Enterokoklarda hücre duvarı, beta-D glikoz-1-fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Opsonik antikorlar için hedef olan bu yapılarda virulansın yanı sıra karşı koruyucu immünite için hedef rolü oynarlar. Bu sebeple aşı oluşturmadaki önemleri araştırılmaktadır (Upadhyaya ve ark., 2009; Akçimen, 2010; Radhoani ve ark., 2010).

### **2.3.7. Lipoteikoik asit (LTA)**

LTA, poligliserol fosfat omurgasına kovalent bağlarla glikolipit rezidülerin bağlanması ile oluşan bir amfipatik moleküldür. Bu molekülün lipit parçası; trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi pek çok ökaryotik hücreye bağlanabilmektedir. *E. faecalis* suşlarında adhezif özelliği gösterilen LTA'nın donör hücre tarafından üretilen agregasyon faktörü için alıcı hücrede reseptör olarak fonksiyon gördüğü ve bu yüzden plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak *E. faecalis*'in virulansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Fabretti ve ark., 2006).

*E. faecalis* ve diğer bazı Gram pozitif bakterilerde LTA'nın immunomodülatör gibi rol oynayarak PMNL'den, TNF- $\alpha$ , İL1- $\beta$ , IL6, IL8 ve PGE-2 gibi inflamatuvar mediyatörlerin, süperoksit radikallerinin ve lizozomal enzimlerin salınımını artırdığı gösterilmiştir. Hücre ve doku kültüründe yapılan çalışmalarda streptokokların LTA'nın apopitotik hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir. *E. hirae* ATCC 9790 suşunun LTA'inin otolizisi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Fabretti ve ark., 2006).

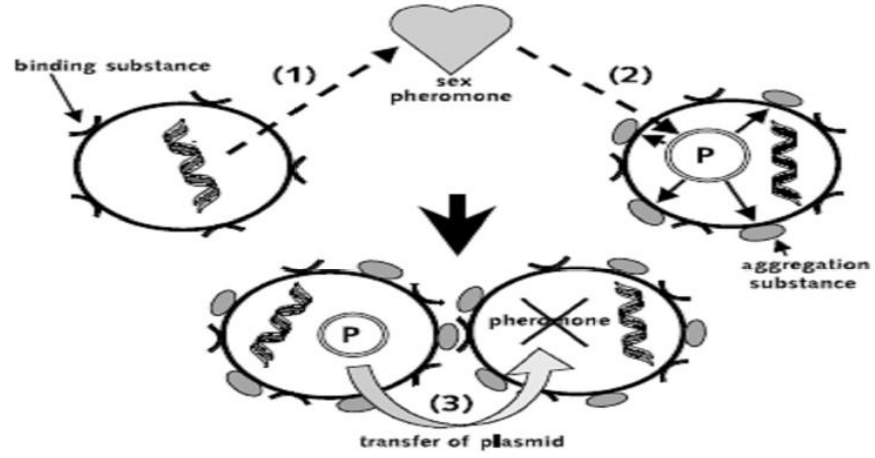
### 2.3.8. Süperoksitler

*E. faecalis*'lerin çoğu ve bazı *E. faecium* türleri tarafından ekstraselüler süperoksitlerin sentezlenip mikro-çevreye salındığı, bunun da bakterinin hayat süresini uzattığı gösterilmiştir. Enterokoksik bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik suşların gaita kökenli izolatlardan daha yüksek oranda süperoksit radikali ürettiği gösterilerek, süperoksit üretiminin virulansla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Devriese ve ark., 2006; Upadhyaya ve ark., 2009).

### 2.3.9. Seks feromonları

Seks feromonları kromozomda kodlanan, 7-8 amino asit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. *E. faecalis*'te sinyal peptitleri olarak fonksiyon görürler. *E. faecalis*'te belirli konjugatif plazmidlerin transferi seks feromon sistemi ile birkaç kat artırılır. Alıcı bir suş besiyerine plazmidle uyumlu ancak onunla taşınmayan seks feromonları sekrete eder, cevap olarak verici suş Af sekrete eder. Böylece alıcı ve verici hücre arasında sıkı temas sağlanır ve konjugatif plazmidin geçişini kolaylaştırır (Şekil 4). Ayrıca antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virulans faktörleri seks feromon sistemi ile *E. faecalis* suşları arasında yayılabilir (Şekil 5) (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Nakayama ve ark., 2007).

Bazı seks feromonları nötrofiller için kemotaktiktir, süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükler ve doku hasarı oluşturur (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Çöleri ve Çökmüş, 2008).



Şekil 5. Seks feromon sistemi transfer mekanizması (Akçimen, 2010)

### 2.3.10. Hyaluronidaz (*hyl*)

Streptokokların dışında stafilokoklar gibi bazı Gram pozitif bakterilerde hyaluronidaz geninde (*hyl*) kodlanan hyaluronidaz enzimi, doğada sülük ve kancalı kurtlar gibi parazitler, zehirli yılanlar ve spermatozoa gibi memeli hücreleri tarafından da üretilir. Hyaluronidaz, hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan bir enzimdir. Bağ dokudaki mukopolisakkaritlerin bir kısmını depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Ayrıca hyaluronik asidin degradasyon ürünü olan disakkaritler de bakteriler için besin kaynağı olabilir. Hyaluronidaz kendi zarar verici etkilerine ek olarak, diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini kolaylaştırabilir ve doku hasarının şiddetini artırır. Diş çürüklerindeki doku hasarında rol oynayan hyaluronidaz enzimi, enterokokların kök kanalından periapikal lezyonlara geçişini kolaylaştırmaktadır (Sedgley ve ark., 2004; Radhoani ve ark., 2010).

### 2.3.11. *Enterococcus faecalis* antijen A proteini (*EfaA* proteini)

İlk olarak endokarditlerden izole edilen *E. faecalis* suşlarında tanımlanan EfaA proteini, *efaA* geninde kodlanır. EfaA'nın aminoasit dizisi, streptokokal adhesinler olarak bilinen proteinlerle %55-60 homoloji göstermektedir. EfaA, mangan transport sistemi için solut bağlayan protein reseptörüdür. Mikroorganizmanın yaşaması ve çoğalması için mangan gerekir ve *efaA* mangandan fakir ortamda fazla miktarda eksprese edilir. EfaA, endokarditler de adhesin olarak fonksiyon gördüğü, ancak bütün

klirik 6rneklerden, hastane ortamından, süt, peynir ve et gibi gıda izolatlarından izole edilen *E. faecalis* suşlarında da *efaA*'nin bulunduğu gösterilmiştir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Sedgley ve ark.2004).

#### **2.3.12. Enterocin AS-48**

İlk olarak *E. faecalis* S-48 suşundan izole edilmiştir. Plazmid de kodlanan peptit yapılı bir bakteriosin olup Gram pozitif ve Gram negatif birçok bakteriye karşı sitolitik aktivite gösterir. Pozitif şarjlı olduğu için ve iyon geçişini indüklemesinden dolayı, hedef hücrede sitoplazmik membran potansiyelinin bozulmasına yol açtığı düşünölmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004).

#### **2.3.13. Antibiyotik direnci**

Nozokomiyal enterokokal enfeksiyonlar, hastanın antibiyotik kullanımı sonucu intestinal florasında bulunan duyarlı suşların ortadan kalkmaları ile birlikte antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virölans özelliklerine sahip suşların intestinal floraya hakim olması ile başlar. Bu suşlar translokasyonla endojen kökenli çevreye yayılmak sureti ile de duyarlı hayvan ve insanlarda ekzojen kökenli enfeksiyonlara yol açarlar. Bu suşlarda görölen antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır (Klare ve ark., 2003; Khan ve ark., 2005; Aktaş ve Derbentli, 2009).

#### **2.4. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları**

Enterokoklar diğer Gram pozitif bakterilerin duyarlı olduğu birçok antibiyotiğe kısmen veya tamamen dirençlidir. Bu sebeple insan ve hayvanlarda enterokok enfeksiyonlarının tedavisi karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir.

Enterokoklar da antibiyotiklere direncin mekanizması iki ana grupta incelenebilir.

- 1- İntrinsik (doğal-kromozomal) direnç
- 2- Ekstrinsik (kazanılmış) direnç

#### 2.4.1. İntrinsik direnç

İntrinsik direnç türe/cinse özgüdür. Enterokok türlerinin tamamında görülen kromozomal direnci ifade eder. Mesela enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametaksazol (SXT)'e, aminoglikozidlere (düşük düzeyde), polimiksinlere, monobaktamlara ve kuinupristin/dalfopristin'e karşı kalıtsal olarak dirençlidir (Çetinkaya ve ark., 2000; Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004).

##### 2.4.1.1. $\beta$ -laktam direnci

Enterokoklar  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı karakteristik olarak tolerans gösterirler, yani tedavi dozunda minimum bakterisidal konsantrasyon/minimum inhibitör konsantrasyon (MBK/MİK) oranı 1/32'nin üzerindedir. Bu nedenle  $\beta$ -laktam antibiyotikler enterokoklara karşı bakterisidal değil, bakteriyostatik etkilidir. Enterokoklarda enterensek penisilin direnci,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren penisilin bağlayan protein 5 (PBP-5) enziminin varlığına bağlıdır. *E. faecalis* suşlarında penisilin MİK değeri streptokoklardan 10-100 kat daha yüksektir. Diğer taraftan da *E. faecium* suşlarında penisilin direnci *E. faecalis*'e oranla daha sık görülmektedir. Enterokoklarda yarı sentetik ve penisilinaza dirençli  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşıda intrinsik direnç oldukça yüksek oranda bulunmuştur. Ampisilin direnci *E. faecium* suşlarının %85-90'ında, *E. faecalis* suşlarının ise %2-3'ünde görülmektedir (Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004; Marothi ve ark., 2005).

##### 2.4.1.2. Aminoglikozid direnci

Enterokoklarda görülen düşük düzeyde aminoglikozid direnci, bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanır. Aminoglikozidler bakteri hücre duvarından enerji bağımlı mekanizma ile geçtiklerinden ve enterokoklarda sitokrom enzimleri olmadığından geçirgenlik azalmaktadır. Ancak aminoglikozid grubu ilaçlar, hücre duvarı sentezini engelleyen  $\beta$ -laktam'lar gibi antibiyotikler ile kombine edilirse zedelenen hücre duvarından daha kolay geçeceklerinden sinerjistik etki oluşacak ve

MİK değerleri önemli ölçüde düşecektir (Klare ve ark., 2003; Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004).

#### **2.4.1.3. Diğer antibiyotiklere direnç**

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler. Ayrıca enterokokların eksojen folatı kullanma yetenekleri olduğundan SXT'ye de interensek olarak dirençlidirler. İn vitro şartlar da duyarlı görülseler de, in vivo şartlarda etkisizdirler. *E. faecalis* intrinsik olarak kuinupristin/dalfopristin'de dirençlidir. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens*'te intrinsik olarak vankomisine düşük düzeyde direnç gösterirler (Çetinkaya ve ark., 2000; Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004).

#### **2.4.2. Ekstrinsik direnç**

Kazanılmış direnç genellikle DNA mutasyonları veya transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genoma transferi sonucu gelişir. En sık görülen mekanizma konjugasyondur (Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004; Çöler ve Çökmüş, 2008).

##### **2.4.2.1. $\beta$ -laktam direnci**

$\beta$ -laktam direnci Enterokok cinsi bakterilerin tipik özelliğidir. Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç kazanır. Direncin major mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilinin hücre içine girişinin azalmasıdır. Penisilin direnci, enterokoklarda bulunan PBP5 miktarı ile doğru orantılıdır ve sıklıkla *E. faecium* suşlarında görülür. PBP5 sentez yeteneğinin kaybının, penisiline oldukça dirençli suşların hiper duyarlı olmasına neden olduğu gösterilmiştir (Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004; Marothi ve ark., 2005).

$\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin diğer mekanizması ise  $\beta$ -laktamaz üretimidir.  $\beta$ -laktamaz üreten enterokoklar nadir olarak izole edilmektedir.  $\beta$ -laktamaz üreten ilk suş 1981 yılında Murray ve ark. tarafından ABD'de tanımlanmıştır.  $\beta$ -

laktamazların çoğu yüksek düzeyde gentamisin direnç genini de taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmıştır. Enterokoklardaki  $\beta$ -laktamazlar penisillin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisillinleri hidrolize eder; penisilinaza dirençli penisillinleri, sefalosporinleri ve imipenemi etkilemez. Stafilokoklardan farklı olarak, enterokoklarda  $\beta$ -laktamaz üretimi konstitüf, düşük seviyede ve inokulum bağımlıdır (Murray, 1998; Lukasova ve Sustakova, 2003; Yetkin ve ark., 2004; Marothi ve ark., 2005).

#### 2.4.2.2. Aminoglikozid direnci

Enterokoklarda aminoglikozidlere karşı direnç iki farklı mekanizma ile ortaya çıkar.

- a- İlmli seviyede direnç (MIK= 62-500  $\mu\text{g/ml}$ ): Genellikle düşük permeabiliteden dolayı gelişir. Aminoglikozidlerin hücre duvarı sentezini inhibe eden  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerle kombine edilerek kullanımı ile bu tip direnç problemi aşılabılır.
- b- Yüksek seviyede direnç (MIK>2000  $\mu\text{g/ml}$ ): Aminoglikozidlerin ribozomdaki bağlanma bölgelerindeki değişiklik sonucu veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşur.

Yüksek düzeyli dirence yol açan bu iki yoldan aminoglikozid modifiye eden enzim üretimi en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Bu enzimler ile ilişkili genle plazmid veya transpozonda yerleşmiş olup, asetil transferaz, adeniltransferaz ve fosfotransferaz olmak üzere üç tip enzim kodlarlar (Murray, 1998; Yetkin ve ark., 2004).

Enterokoklarda gentamisin ve streptomisine karşı direnç farklı mekanizmalarla oluştuğundan, duyarlılık testlerinde bu ajanların ikisinin de kullanılması önemlidir. Streptomisin hariç diğer aminoglikozidlere yüksek seviyede dirençten yaygın olarak bifonksiyonel enzim olan 6'Asetil transferaz-2''fosfotransferaz -AAC(6')-APH(2'')-sorumludur. Bu enzim, gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin ve kanamisine direnç oluşumunu sağlar. Bu yüzden gentamisin direnci, streptomisin hariç diğer aminoglikozidlere olan direncin iyi bir göstergesidir. Streptomisin direnci ise ribozomal mutasyonlar veya adenil transferaz sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır ve bu suşlar gentamisine duyarlı kalmaktadır. Penisilin-aminoglikozid sinerjisi, streptomisin'in MİK

değerinin 2000 µg/ml, gentamisin'in MİK değerinin 500 µg/ml veya daha yüksek olduğu yüksek seviyede aminoglikozid direnci olan enterokoklarda ortaya çıkmamaktadır (Chow, 2000; Çetinkaya ve ark., 2000; Yetkin ve ark., 2004).

#### **2.4.2.3. Kloramfenikol direnci**

Enterokokların %20-42'si kloramfenikole dirençlidir ve dirençten sorumlu esas mekanizma, plazmid üzerinde “*cat*” geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Ayrıca efluks mekanizması da dirençte rol alabilir (Murray, 1998; Yetkin ve ark., 2004).

#### **2.4.2.4. Tetrasiklin direnci**

Dirençten sorumlu *tetM*, *tetQ*, *tetN* ve *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetL* geni bir plazmid de taşınır. Bu genler efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribozomal kaynaklı dirence de sebep olabilir. Tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan gen, tetrasiklin ile temas sonucu indüklenir. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yolu ile kazanılan direncin en tipik örneğidir (Murray, 1998; Yetkin ve ark., 2004).

#### **2.4.2.5. Kinolon direnci**

Direnç *gyrA* (giraz) ve *parC* (topoizomera) genlerindeki mutasyonlara bağlı gelişir. Enterokokal suşların çoğunluğu kinolonlara intermediate duyarlılık veya direnç gösterir (Klare ve ark., 2003; Frye ve Jackson, 2013).

#### **2.4.2.6. MLSB (Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin) direnci**

Genellikle 23S *rRNA*'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkilidir ve metilasyon sonucu eritromisin ribozomlara bağlanamaz. *ermB* geni *Tn917* transpozonu ile çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilmektedir. Ayrıca asetil transferaz veya efluks mekanizması sonucu da oluşabilir (Smith ve ark., 2005; Lopez ve ark., 2010).

#### 2.4.2.7. Oksazolidinon direnci

Çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklar ile oluşan enfeksiyonlarda oksazolidinon grubu antibiyotik olan linezolid iyi bir seçenektir. Ancak 2002 yılında linezolid direnç bildirilmiştir ve bu dirençten 23S *rRNA* V domainindeki mutasyonlar (G-2576-T) sorumlu tutulmaktadır (Klare ve ark., 2003; Lukasova ve Sustakova, 2003; Wolter ve ark., 2005; Raponi ve ark., 2010).

#### 2.4.2.8. Glikopeptit direnci

Enterokoklarda vankomisin ve teikoplanin en çok kullanılan glikopeptitlerdir. Enterokoklarda, normal şartlar altında, peptidoglikan sentezinde, iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanır ve “D-Ala-D-Ala” yı oluşturur. Daha sonra UDP-N-asetil muramil tripeptide eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptit meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana bağlanır, kros bağların oluşumunu sağlar ve peptidoglikan tabakanın gücüne katkıda bulunur. Vankomisin pentapeptit prekürsör ünitesinin D-Ala-D-Ala kısmına yüksek affinite ile bağlanır ve peptidoglikan zincire bağlanmasını bloke ederek kros bağların oluşumunu önler. Ancak peptidoglikan yan zincirine D-Ala-D-Ala yerine ligaz enzimi ile D-Ala-D-Laktat veya D-Ala-D-Serinin sentezlenerek bağlanması sonucunda, vankomisinin buraya bağlanma yeteneği azalır, hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir. Direncin sınıflandırılması önceleri, fenotipik olarak, MİK değerlerine göre yapılmıştır. Günümüzde ise sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. VanA, VanB, VanD, VanM ve VanG tipi dirençte D-Ala-D-Laktat; VanC, VanL, VanN ve VanE tipi dirençte ise D-Ala-D-Serin sentezlenmektedir (French, 1998; Çetinkaya ve ark., 2000; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

##### 2.4.2.8.1. Fenotipik tanımlama

Fenotipik olarak Vankomisin direnci, VanA, VanB, VanC, VanD, VanE ve VanG olmak üzere 6 farklı tipte oluşabilir. VanA ve VanB direnç fenotipi, enterokoklarda önceden bulunmayan, yeni kazanılmış gen dizilerinden kaynaklanır ve ilk olarak *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır (Tablo 4) (Murray, 1998; Çetinkaya ve ark., 2000; Çöleri ve Çökmüş, 2008; Nam ve ark., 2013).

VanA tipi dirençte; indüklenabilir yüksek seviyede vankomisin ( $MİK \geq 64 \mu\text{g/ml}$ ) ve teikoplanin direnci ( $MİK \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) görülür. Direnç vankomisin, teikoplanin, avoparsin ve ristosetin gibi glikopeptitler ve basitrasın, polimiksin B ve robenidin gibi nonglikopeptitler ile indüklenabilir (Alp ve Şardan, 2008; Oravcova ve ark., 2013).

VanB tipi dirençte ise; vankomisine daha ılımlı seviyede indüklenabilir direnç [Vankomisin  $MİK \geq 32-64 \mu\text{g/ml}$  (4-1000  $\mu\text{g/ml}$ )] görülürken teikoplanine duyarlılık devam etmektedir. VanA direnç determinantları, tüm enterokok izolatları arasında transfer edilebilen büyük mobil bir elementte yerleşmişken, VanB sadece *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında görülür (Çetinkaya ve ark., 2000; Alp ve Şardan, 2008; Oravcova ve ark., 2013).

VanC tipi direnç ise *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*'da tanımlanmıştır ve intrinsik düşük seviyede vankomisin direnci ( $MİK \geq 4-32 \mu\text{g/ml}$ ) ve teikoplanine duyarlılık görülür (Çetinkaya ve ark., 2000; Lemke ve Bülte, 2000; Alp ve Şardan, 2008; Oravcova ve ark., 2013).

Bu sınıflandırma metotlarının bazı dezavantajları vardır. Örneğin VanA fenotipinin genetik göstergeleri *E. gallinarum* ve diğer enterokoklarda ortaya çıkmaktadır. Bir VanA tipi direnç görülen *E. avium* suşunda, teikoplanine tipik seviyede direnç olmasına karşın vankomisine daha düşük seviyede direnç ( $MİK \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) tespit edilmiştir. Ayrıca VanB suşlarından köken alan mutantlar, teikoplanine direnç gösterebilmekte ve bu yüzden de fenotipik olarak VanA suşlarından ayırt edilememektedir. Bu dezavantajlarına rağmen, fenotipik sınıflandırma şeması, laboratuarlarda kolay kullanımı, düşük maliyeti ve genotipik sınıflandırma ile iyi uyum göstermesi sebebi ile hala kullanılmaktadır (Çetinkaya ve ark., 2000).

**Tablo 4.** Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri (Akçimen, 2010)

|                                 | VanA                                                                                                                                                   | VanB                                                                                       | VanC                                                                    | VanD              | VanE               | VanG               |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Peptidoglikan Prekürsör         | D-Ala-D-Laktat                                                                                                                                         | D-Ala-D-Laktat                                                                             | D-Ala-D-Serin                                                           | D-Ala-D-Laktat    | D-Ala-D-Serin      | D-Ala-D-Laktat     |
| Ligaz geni                      | vanA                                                                                                                                                   | vanB                                                                                       | vanC1<br>vanC2<br>vanC3                                                 | vanD              | vanE               | vanG               |
| Direnç geninin kaynağı          | Kazanılmış                                                                                                                                             | Kazanılmış                                                                                 | Yapısal                                                                 | Kazanılmış        | Kazanılmış         | Kazanılmış         |
| Vankomisin MİK µg/ml            | 64->1000                                                                                                                                               | 4->1000                                                                                    | 2-32                                                                    | 64-256            | 16                 | 16                 |
| Teikoplanin MİK µg/ml           | 16-512                                                                                                                                                 | 0,5->32                                                                                    | 0,5-1                                                                   | 4-32              | 0,5                | 0,5                |
| Direnç geninin bulunduğu türler | <i>E. faecium</i><br><i>E. faecalis</i><br><i>E. casseliflavus</i><br><i>E. gallinarum</i><br><i>E. durans</i><br><i>E. mundtii</i><br><i>E. avium</i> | <i>E. faecalis</i><br><i>E. casseliflavus</i><br><i>E. gallinarum</i><br><i>E. faecium</i> | <i>E. gallinarum</i><br><i>E. casseliflavus</i><br><i>E. flavescens</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecalis</i> |
| Transfer edilebilirlik          | Evet                                                                                                                                                   | Evet                                                                                       | Hayır                                                                   | Hayır             | Hayır              | Hayır              |

#### 2.4.2.8.2. Genotipik tanımlama

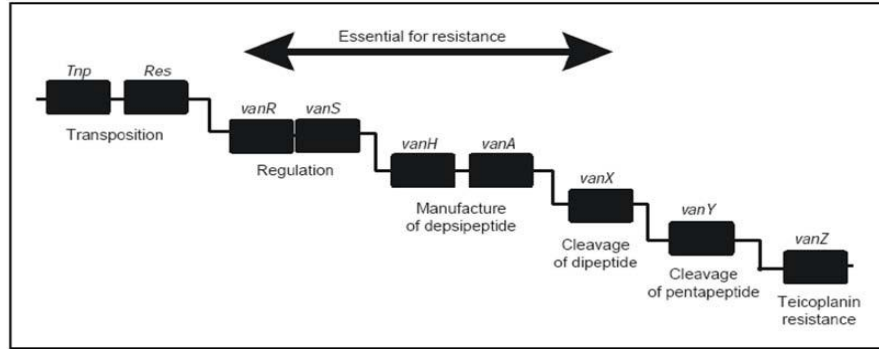
*vanA*, *vanB*, *vanC* (C1-C2-C3) genlerinin yanında yeni izole edilen *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* direncin belirlenmesinde önemli genlerdir (Courvalin, 2006; Boyd ve ark., 2008; Xu ve ark., 2010; Lebreton ve ark., 2011).

##### 2.4.2.8.2.1. VanA glikopeptit direnci

VanA tipi direnç enterokoklarda en iyi tanımlanan ve en sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır. Vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençten, 39-40 kDa ağırlığında, VanA sitoplazmik proteinleri sorumludur. *vanA* geni ve direnç ekspresyonu ile regülasyondan sorumlu *vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanX* ve *vanZ* gibi diğer genler, *E. faecium*'da sıklıkla bir plazmid üzerinde bulunan 10581bp'lik bir transpozon (Tn 1546) da yerleşmektedir. Bu genlerin ekspresyonu sonucu, peptidoglikan prekürsörlerin terminalinde D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Laktat sentezlenmekte ve vankomisin bu

bileşiğe daha düşük affinite ile bağlanmaktadır (French, 1998; Çetinkaya ve ark., 2000; Reynolds ve Courvalin, 2005; Dendle ve ark., 2009).

VanA operonunda *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* ve *vanZ* genleri yer alır (Şekil 6).



Şekil 6: VanA operonu (Akçimen, 2010)

VanR ve VanS proteinleri, *vanHAX* gen kümesinin transkripsiyonunu düzenleyen iki komponentli bir regülâtör sistem oluşturur. *vanS*, sensör gendir ve vankomisin varlığını algılamada veya tanımda rol alan VanS proteinini kodlar. *vanR*, regülâtör gendir ve diğer direnç genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunda görev alan VanR proteinini kodlar. VanS, VanR' ye sinyal verir ve dirençte yer alan VanH, VanA ve VanX gibi diğer bazı proteinlerin sentezi veya aktivasyonu ile sonuçlanan regülâtör cevabı oluşturur. VanA tipi suşlarda hem vankomisin hem de teikoplanin transkripsiyonu indükleyebilir ancak kesin sinyaller hala bilinmemektedir.

VanA, VanH ve VanX proteinleri kor proteinleridir.

*vanA*, D-Ala-D-laktat oluşumunu sağlayan bir ligaz proteini kodlar. VanA tek başına vankomisin direncini sağlayamaz, çünkü D-Laktat gibi D-hidroksi asitler, enterokoklarda genellikle sentezlenmez ve enterokokların çevresinde doğal olarak bulunmazlar. Bu yüzden D-laktat sentezlemek için enterokoklar, VanA için substrat üretiminde gerekli olan *vanA* operonu içindeki genleri kazanmalıdır. *vanH*, piruvattan D-Laktat sentezini sağlayan bir dehidrogenaz enzimini kodlar ve D-laktat havuzunun oluşumunu sağlar. *vanX*, bir DD-dipeptidaz enzimi olan VanX proteinini kodlar. D-Ala-D-Ala havuzunu doğal bir enterokokal ligaz ile azaltarak, yarışma sureti ile normal pentapentit sentezini azaltır. D-Ala-D-Laktata karşı aktivitesi yoktur. *vanY* D-D-

karboksipeptidaz olan VanY proteinini kodlar ve peptidin sonundaki D-Ala'yı ayırır ve ılımlı seviyede direnci sağlar. *vanZ*, ılımlı olarak teikoplanin MİK değerini arttırır ama vankomisin MİK değerini arttırmaz. Bunun mekanizması henüz aydınlatılmamıştır. *vanY* ve *vanZ* dirence katkıda bulunabilir ama direnç için zorunlu değildir.

*vanA* geni ilk olarak *E. faecium*'da, sonraları ise *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde de belirlenmiştir.

VanA tipi direnç Avrupa'da en çok görülen direnç tipidir. ABD'de VanB suşları oldukça yaygın olmasına rağmen VanA hala daha baskın direnç tipidir. *vanA* ligaz geni enterokokal türlerin büyük kısmında ve *Corynebacterium spp.*, *Arcanobacterium haemolyticum* ve *Lactococcus spp.* ' lerde bulunmaktadır. ABD izolatlarında *vanA* gen kümesinin haritalanmasında bazı heterojenlikler görülmüştür. Tn 1546 bazı suşlarda intakt olarak bulunur fakat bazılarında *vanS* ve *vanH* arasında yer alan insersiyon dizisi de vardır. Bu vankomisin direnç genleri, ek olarak insersiyon elementleri içeren daha büyük mobil elementlere inkorpore olabilir (French, 1998; Çetinkaya ve ark., 2000; Reynolds ve Courvalin, 2005; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

#### 2.4.2.8.2.2. VanB glikopeptit direnci

Enterokoklarda VanB glikopeptit direnci, yapısal olarak VanA ligaz ile %77 aminoasit benzerliği gösteren anormal bir ligaz olan VanB ile oluşturulur. Sadece VanB direncine özgü bir gen dışında diğer altı genin (Van Z<sub>B</sub> hariç), kümesindeki genlerle %77 homoloji gösterdiği saptanmıştır. VanB direnç tipi, VanA tipi dirençte olduğu gibi Van R<sub>B</sub>, Van S<sub>B</sub>, Van H<sub>B</sub>, Van A<sub>B</sub>, Van X<sub>B</sub>, Van Y<sub>B</sub> ve Van Z<sub>B</sub> adlı yedi farklı gen kümesi içerir. *vanB*, kromozomal yerleşimlidir. Ancak transpozon, Tn-1547 ve Tn-5382 veya plazmid üzerinde de taşınabilir ve transfer edilebilir (Murray, 1998; Çetinkaya ve ark., 2000; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

VanB proteini, D-Ala-D-Laktat ile sonlanan pentapeptit oluşumuna yardımcı olur. VanA direncine benzer genler; *vanHB*, *vanXB*, *vanYB*, *vanRB* ve *vanSB* ile gösterilir. D-D dipeptidaz (VanXB) aktivitesinin seviyesi vankomisin direnç düzeyi ile ilişkilidir. VanHAX ve VanHBBXB arasında yaklaşık %70 dizi benzerliği bulunurken,

VanA ve VanB tipi VRE lerin RS ve Y proteinleri arasında %25-35 dizi homolojisi varır. VanB organizmalarda *vanZ*' ye benzer gen yoktur. *vanYB* bütün suşlarda bulunmaz ve gendeki pozisyonu *Tn1546*'daki *vanY*'den farklıdır.

Son çalışmalarda *vanB* ligaz geninin DNA dizi heterojenitesi gösterdiği ve *vanB-1*, *vanB-2* ve *vanB-3* olmak üzere 3 subtipi olduğu gösterilmiştir. VanB sınıfı suşlardaki regülatör sistem teikoplanin ile indüklenmeye duyarsızdır. Teikoplanin *vanA* ilişkili protein sentezini indükler fakat *vanB* ilişkili protein sentezini indüklemey. Diğer yandan vankomisin her iki sistemde direnç proteinleri sentezini indükler. Şayet *vanB* gen kümesindeki teikoplanine duyarlı enterokoklar önceden vankomisine maruz kalırsa, teikoplanin direnci gelişebilir (Çetinkaya ve ark., 2000; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

#### 2.4.2.8.2.3. VanC glikopeptit direnci

*E. gallinarum*'un VanC-ligazı, D-Ala-D-serin ile sonlanan pentapeptidi oluşumunu sağlar. D-Ala yerine D-serin'in girişi, vankomisine affiniteyi azaltır. Peptidoglikan yapıda D-Ala-D-Serin'in D-Ala-D-Alanin'e oranındaki farklılık, VanC fenotipi taşıyan VRE izolatları arasındaki vankomisin direnci farklılığına yol açar. D-Ala-D-Ala'nın yüksek oranda olması, daha düşük MİK değerlerini, D-Ala-D-Seri oranının daha yüksek olması da daha yüksek MİK değerini açıklayabilir. VanC tip dirence sahip suşlar teikoplanine duyarlıdır. VanC tipi direnç yapısalıdır, indüklenemez ve transfer edilemez. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescentis*'te vankomisine düşük düzeyde direnç tipiktir. *E. flavescentis*'in enterokokal türler arasında olup olmadığı hakkında bazı anlaşmazlıklar olmasına rağmen; *E. gallinarum*'da *vanC-1* geni, *E. casseliflavus*'ta *vanC-2* ve *E. flavescentis*'te *vanC-3* geni nükleotid dizileri bildirilmiştir (Dutka-Malen, 1994; Çetinkaya ve ark., 2000; Klare ve ark., 2003; Reynolds ve Courvalin, 2005; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

#### 2.4.2.8.2.4. VanD glikopeptit direnci

İlk kez 1991 yılında New York hastanesinde bir *E. faecium* izolatında *vanD* olarak tanımlanan yeni bir vankomisin direnç geni tanımlanmıştır. Bu suşlar 64-256 µg/ml vankomisin ve 4-32 µg/ml teikoplanin ile inhibe edilmiştir. Bu genin; *vanA* ve *vanB* ligaz genlerine %67 oranında benzerlik gösterdiği, kromozomda yerleştiği ve

konjugasyonla diğer enterokoklara transfer edilemediği anlaşılmıştır. Ancak VanD suslarında D,D dipeptidaz aktivitesi belirlenmemiştir ve karboksipeptidaz aktivitesi ise düşük düzeydedir. D,D-dipeptidaz aktivitesi bulunmamasına rağmen *vanD* gen kümesi *vanXD*, *vanRD*, *vanSD*, *vanHD* genlerini içermektedir (Çetinkaya ve ark., 2000; Klare ve ark., 2003; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

#### 2.4.2.8.2.5. VanE glikopeptit direnci

*vanE* vankomisin direnç geni, vankomisine düşük seviyede dirençli (MİK 16 µg/ml) ve teikoplanine duyarlı (MİK 0.5µg/ml) *E. faecalis* BM4405 suşunda tanımlanmıştır. Bu yeni direnç fenotipi intrinsik VanC tipi dirence benzer. Aminoasit dizisi VanC'ye %55, VanA'ya %45, VanB'ye %43 ve VanD'ye %44 oranında benzemektedir. D-ala-D-serin pentapeptid oluşumu ile sonlanır. VanE tipi direncin genetik belirleyicisi farklıdır ve intrinsik bir direnç tipi değildir. *vanE* geni kromozomda yerleşmiştir ve transfer edilemez (Çetinkaya ve ark., 2000; Courvalin 2006; Boyd ve ark., 2008; Xu ve ark., 2010; Lebreton ve ark., 2011).

#### 2.4.2.8.2.6. VanG glikopeptit direnci

Bu direnç tipi *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Bu suş vankomisine düşük düzeyde (MİK=16µg/ml) dirençli, teikoplanine duyarlıdır (MİK=0,5 µg/ml). VanG geni, kromozom üzerinde bulunur ancak hareket etme özelliği yoktur. Bu direnç tipi transfer edilemez. VanG gen kümesinin ürünü diğer van genlerinin ürünlerine %50 den daha az aminoasit dizilim benzerliği göstermektedir (Çetinkaya ve ark., 2000; Reynolds ve Courvalin, 2005; Courvalin, 2006; Xu ve ark., 2010; Nilsson ve ark., 2012).

VanM küme organizasyonu, VanD ile en çok benzemesine rağmen iki genin birbirinden farklı olarak karakter gösterdiği bildirilmiştir. VanD vankomisin ve teikoplanine orta düzeyde direnç sağlayan, kromozom üzerinde lokalize olmuş ve konjugasyon ile aktarılamayan bir özellik göstermektedir. VanM ise vankomisin ve teikoplanine yüksek direnç gösteren, plazmit üzerine lokalize olmuş ve transfer edilebilir bir özellik göstermektedir (Courvalin 2006; Xu ve ark. 2010; Nilsson 2012).

VanN en yeni direnç geni olarak bulunmuş, sadece vankomisin direnci sağlayan ve sadece D-ala-D-ser ligase özelliğindedir ve konjugasyon ile transfer edilebilmektedir (Lebreton ve ark. 2011; Frye ve Jackson 2013).

#### **2.4.2.8.2.7. Vankomisin bağımlı enterokoklar (VDE)**

VanA ve VanB tipi VRE'lerin bazı suşlarında oluşan ilginç bir fenomen vankomisin bağımlılığıdır. Bu enterokoklar üremeleri için vankomisine ihtiyaç duyarlar. VDE'ler, *Campylobacter* veya gonokokların izolasyonun da kullanılan vankomisin içeren agara ekilen klinik örneklerden elde edilmiştir. Bu izolatlarda doğal ligaz (*ddl*) genlerinde mutasyon sonucu D-Ala-D-Ala'nın normal üretimini sonlandırır ve sonra yedek bir dipeptit benzeri yapı varsa üreyebilir. VanA ve VanB tipi enterokokların çoğunda yalnızca vankomisin varlığında ortaya çıkar, vankomisin D-Ala-D-Laktat oluşumunda rol alan dehidrogenaz (VanH) ve ligaz (VanA veya VanB) sentezini indükler ve oluşan D-Ala-D-Laktat hücre duvarı sentezinde kullanılır. Vankomisin uzaklaştırıldığında D-Ala-D-Laktat daha fazla sentezlenmez ve D-Ala-Dala veya D-Ala-D-Laktat olmadan hücre çoğalmaya devam edemez (Çetinkaya ve ark., 2000; Tambyah ve ark., 2004).

Vankomisin bağımsızlığına geri dönüş de incelenmiş, dönüşümün muhtemelen ya D-Ala-D-laktat konstitütif üretimine yol açan bir mutasyon veya D-Ala-D-Ala sentezini eski haline getiren bir mutasyon ile ortaya çıktığı kanaatine varılmıştır. VDE'ların VRE'ye benzer pulsed field jel elektroforez kalıplarına sahip olduğu bulunmuştur (Çetinkaya ve ark., 2000; Tambyah ve ark., 2004).

### **2.5. Kolonizasyon ve Risk Faktörleri**

Vankomisin dirençli enterokok kolonizasyonu, insan ve hayvanlarda herhangi bir enfeksiyon klinik bulgusu olmaksızın VRE kültür pozitifliği olarak tanımlanabilir. Kolonizasyon bölgesi sıklıkla intestinal ve alt üriner sistemdir. Hiçbir semptomu yol açmayan kolonizasyon uzun süre devam edebilir. İnsan ve hayvanlarda ekzojen kökenli VRE geçişi için bir kaynak oluşturabilir. İnsanlarda ekzojen kökenli kolonizasyon için hastanede kalış süresi önemli bir risk faktörüdür. Bu sürede kolonize insan ve hayvanların çıkartıları ile direkt veya yetiştirici çiftçilerin kontamine elleri ile indirekt

olarak kolonizasyon olabilir. Kontamine olmuş; hastaya (insan ve hayvanlar) direkt uygulanan elektrokardiyografik monitor, ventilatör tüpü, pompalar, glukozmetre, termometre, tansiyon aleti, stetoskop gibi non-invazif; intravenöz kateterler, fleksible skoplar gibi invazif enstrumanlar risk oluşturabilir. Sağlık personeli, hayvan yetiştiricileri, yaban hayatla kontak halinde bulunan insanların telefon, anahtar, kapı, kapı kolu, pencere, yer döşemesi, yatak başlıkları, hasta yatağı, çarşaf, karyola demiri ve komidin gibi malzemeler ile kurdukları kontakt, indirekt ilişkili olan malzemeler ile temasa bağlı olarak kolonizasyon riski artırabilir. Nitekim bu malzemelerin üzerinde VRE'nin 3-15 gün enfeksiyon yeteneğini sürdürdüğü gösterilmiştir. İshalli insan ve hayvan kolonize hastalarının bulunduğu ortamlarda kontaminasyonun daha yoğun olduğu belirtilmektedir. Hastalardaki ekzojen kökenli VRE olgularının aylar boyunca devam edebileceği bildirilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000; Zırakzadeh ve Patel, 2006; Nam ve ark., 2013).

Ekzojen temasın prognozu ve kolonizasyon risk oranı, VRE ile maruziyete, maruziyetin süresine, konağın duyarlılığına ve maruz kalınan VRE miktarı ile virulans ve kolonizasyon faktörlerinin mevcudiyetine bağlı olarak değişir. VRE ile endojen kökenli enfeksiyonlar karakteristik olarak mikroorganizmanın intestinal sistemden translokasyonu sonucu oluşur. Bu sebeple yüksek riskli birimlerde aktif sürveyans kültürleri ile VRE kolonizasyonunun takibi endojen ve eksojen kaynaklı enfeksiyonların kontrolü için önemlidir (Zırakzadeh ve Patel, 2006; Aktaş ve Derbentli, 2009; Nam ve ark., 2013).

Vankomisin dirençli enterokok kolonizasyonunda hastaya ait faktörler de önemlidir. İnsan ve hayvanlarda, altta yatan ciddi kronik hastalıklar, uzun süreli ve geniş spektrumlu antimikrobiyal ilaç kullanımı, solid organ transplantasyonu veya hematolojik hastalıklar, VRE kolonizasyonu için yüksek risk oluşturur (Alp ve Şardan, 2008; Santos ve ark., 2013).

Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, intestinal florada duyarlı bakterilerin eliminasyonuna yol açarak VRE gibi dirençli bakterilerin kolonizasyonuna ve aşırı çoğalmasına yol açar. Flora bakterilerinin bakteriosinlerin yanı sıra, yabancı bakterilerin yaşamını kısıtlayan buna karşılık sIgA gibi savunma faktörlerinin ömrünü uzatan polyaminler gibi proteinlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bakteriyel

flajellinler, barsak epitel hücreleri ve Paneth hücrelerince salgılanan ve Gram pozitif bakterilere bakterisid etki gösteren bir lektin olan RegIII $\gamma$  ekspresyonunu stimüle ederler. RegIII $\gamma$  ekspresyonu, intestinal epitelde Toll like reseptör-Myeloid diferansiyasyon faktör 88 (TLR-MYD88) yolağının flora bakterilerince direkt veya indirekt olarak uyarılması ile gerçekleşir. RegIII $\gamma$  indüksiyonu hemopoetik hücrelerde TLR-5 ekspresyonunu gerektirir ve bu da IL-22 ekspresyonuna bağlıdır. Metronidazol, neomisin ve vankomisin (MNV) kombinasyonu ile tedavi edilmiş farelerin barsaklarında RegIII $\gamma$  seviyesinin azaldığı ve bunun da VRE kolonizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. MNV alan fareler oral olarak VRE ile enfekte edildiğinde, 24 saat sonrasında kan dolaşımına geçtiği de bildirilmiştir. Bu farelerde sistemik flajellin uygulaması sonrası VRE kolonizasyonu dramatik olarak azalmıştır (Brandl ve ark., 2008; Kinnebrew ve ark., 2010).

Genellikle uzun süreli bakım ünitelerinde kalan hastalar, sağlık çalışanları, kanatlı yetiştiricileri, kanatlı kesimhane personeli (kasaplar), yabani hayatla kontakt halinde bulunan insanlar (avcılar) ve bunların ev halkı da VRE enfeksiyonları için riskli gruplardır. Hayvansal gıda üretilen ortamlar VRE bakımından riskli yerlerdir (Borgen ve ark., 2001; Boogard ve ark., 2002; Junco ve ark., 2005; Lauderdale ve ark., 2007).

Enterokokal enfeksiyonlar her iki cinste eşit olarak görülmektedir. Üriner enfeksiyonlar kadınlarda daha sık olmasına rağmen, enterokoklar komplike olmayan sistitlerin nadir nedenidir. Enterokokal endokarditler ise erkeklerde daha fazla görülür (Derviese, 2006; Akçimen, 2010). Yaşlı hastalarda enterokokal enfeksiyonlar ve kolonizasyon, bu grupta diabet, romatizmal hastalıklar, barsak florasında bozukluklar gibi kronik hastalıkların yanı sıra, üriner kateterizasyon, divertikülit veya safra yolları hastalıkları nedeniyle batın cerrahisi gibi hastalıklar daha sık görüldüğü için, daha yüksek sıklıkta görülür. Hayvanlarda ise bu yönde çalışmalar sınırlıdır. Leme ve ark. (2000) Brezilya da yaptıkları bir çalışmada; 14, 21 ve 35 günlük broylerlerde VRE varlığı ile yaş arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. VRE taşıyıcılığını ile yaş arasında bir ilişki olmadığını ortaya koymuşlar.

Yenidoğanda ise enterokoklar, bakteriyemi ve menenjitte sebep olurlar. Enterokok salgınları daha çok, yenidoğan, yoğun bakım, çocuk yoğun bakım ve

hematoloji-onkoloji ünitelerinde ortaya çıkmaktadır. Ancak her şeye rağmen VRE enfeksiyonları pediatrik hastalarda daha az görülmektedir (Butler, 2006).

## 2.6. Enterokok Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Enterokoklar son yıllarda tüm dünyada giderek artan sıklıkta yol açtıkları hastane enfeksiyonu salgınları ile dikkatleri üzerilerine çekmişlerdir. İlk yapılan epidemiyolojik izlem çalışmaları, enterokokların hastadan hastaya ve hatta hastaneler arası yayılabilmesinde bu bakterilerin normal barsak florasında bulunmasının temel risk faktörü olduğunu, bu sebeple de insan dışkılarından en çok izole edilen tip olan *E. faecalis*'in hastane enfeksiyonlarında %85-95'lik oran ile en yüksek insidansa sahip olan tür olduğunu, bunu barsak florasında ikinci sıklıkta görülen *E. faecium*'un %5-10 oranı ile izlediğini göstermiştir (Çetinkaya ve ark., 2000; Zırakzadeh ve Patel, 2006). Ancak İngiltere'den Uttley ve ark. ile Fransa'dan Leclercq ve ark. tarafından 1986 yılında eş zamanlı olarak vankomisin dirençli enterokokların sebep oldukları enfeksiyonların kliniğine ait ilk bilgiler açıklanması ve direnç özellikleri tespit edildikten sonra 1988 yılında yayınlamalarından sonra enterokoklara bağlı hastane enfeksiyonları epidemiyolojisinde 2 önemli değişiklik yaşanmıştır (Leclercq ve ark., 1988; Uttley ve ark., 1988). Bunlar insidans da ki hızlı artış ve tür dağılımındaki değişimdir. Özellikle Vankomisin'in hastanelerde yaygın olarak kullanılmaya başladığı 1989 yılından itibaren, Avrupa ülkeleri ve ABD'den başta glikopeptid grubu antibiyotikler olmak üzere  $\beta$ -laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı dirençli çok sayıda klinik izolat ve vaka bildirimi yapılmış, VRE'lerin özellikle *E. faecium*'un klonal seleksiyona uğrayarak hastane ortamına hakim olduğu, ya tek başlarına veya stafilokoklarla birlikte hastane enfeksiyonlarındaki insidanslarını hızla artırdıkları tespit edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000).

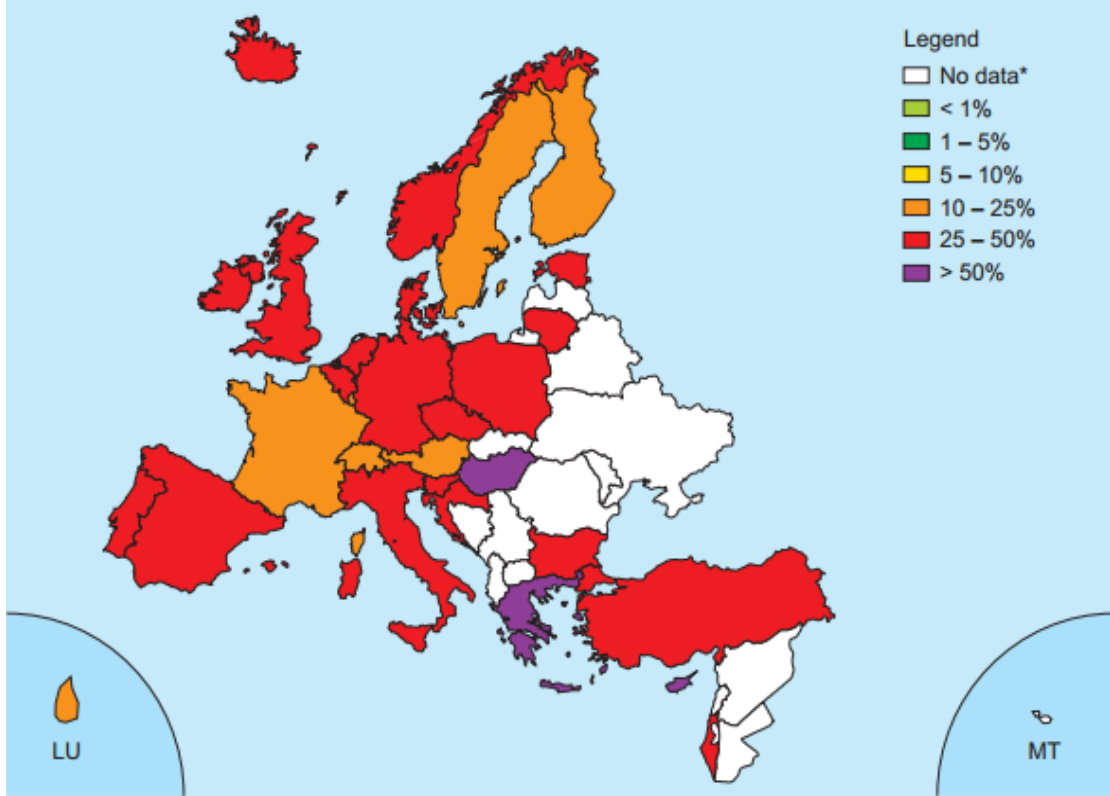
Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1990 -1992 yılları arasında, hastane enfeksiyonları içerisinde enterokokların, *E. coli* ve Stafilokoklardan sonra yaklaşık olarak %10'luk bir insidans ile üçüncü sıklık da yer aldığını bildirilmiştir (Chou ve ark., 2008; Huckabee ve ark., 2009). Farklı hastanelerde yapılan çalışmaların sonuçlarının açıklandığı bildiride, enterokokların hastane kökenli bakteriyemilerin %9'u, cerrahi yara enfeksiyonlarının %13'ü, üriner sistem enfeksiyonlarının %12-16

sından sorumlu olduklarını, enfeksiyonların %60'dan fazlasının da eksojen kaynaklı olduğunu ve yarısından fazlasının da yoğun bakım ünitelerinde görüldüğünü belirtilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000; Chou ve ark., 2008).

Diğer taraftan ABD'den Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Birimi-NNIS'nin verilerinde; hastanelerde 1989-1997 yılları arasındaki peryotta VRE izolasyon oranlarının; yoğun bakım ünitelerinde görülen hastane enfeksiyonlarında %0,4 ten %23,2'ye, diğer ünitelerde ise %0,3'ten %15,4'e yükseldiği bildirilmiştir (Martone, 1998). Aynı birimin 1998 yılı raporunda ise, yoğun bakım servislerinde görülen hastane enfeksiyonlarında %22,6 olan VRE insidansının, 1999 yılında %25'e ve 2003 yılında da %28,5'e yükseldiği gösterilmiştir. Bu bildirimler dışında genel olarak ABD'de 2000'li yılların başlarında hastane enfeksiyonlarında VRE insidansının %25'in üzerine çıktığı, hastanede yatan hastalarda VRE kolonizasyon oranının da %5-18 arasında değiştiği, ancak hastane dışındaki popülasyonda intestinal kolonizasyon olmadığı bildirilmiştir (CDC, 1993; Bonten ve ark., 2001). Benzer şekilde Kanada'dan bildirilen 7 yıllık VRE sürveyans raporuna göre; 2001-2003 yıllarında %0,5 olan enterokok izolatları arasında VRE sıklığı, 2006 yılında %3,3'e çıkmıştır (CNISP, 2006).

Avrupa'da da hastane enfeksiyonlarında, VRE epidemiyolojisinde, ABD'den küçük nüans farkları olmakla beraber benzer artış trendi yaşanmıştır. European Antimicrobial Surveillance System (EARSS)'inin 1998 verilerine göre bakteriyemiye sebep olan *E. faecium* izolatları arasında en yüksek vankomisin direnç oranı İngiltere'de %24 ve İtalya'da ise %10 olarak belirlenmiştir. Ancak aynı sistemin 2007 verilerine göre en düşük VRE insidansı İskandinav ülkelerinde %1 olarak verilirken, Yunanistan ve Portekiz gibi Güney Avrupa ülkelerinde VRE oranının %45'in üzerine çıktığı belirtilmiştir. Almanya'da EARSS verilerine göre 2001'de VR *E. faecium* oranı %1 iken, 2007 yılında bu oran %15'e çıkmış ancak VR *E. faecalis*'lerde bu oran %1'in altında kalmıştır. Fransa'da 2005 yılında GRE. *faecium* oranı %5 olarak bildirilmiştir. İngiltere'de ise 2007 yılında enterokokların sebep olduğu bakteriyemilerde VRE oranı %8,5-12,5 arasında bulunmuştur. Bu oran *E. faecium* için %20-25, *E. faecalis* için %1,6-2,5'tir. İrlanda'da VR *E. faecium* oranı 2005 yılında %30-35 olarak bildirilmekte iken, VR *E. faecalis*'lerde ise bu oran %5'in altında bulunmuştur. İtalya'da ise 1995 yılında VR *E. faecium* oranı %9 iken, 2001'de %15'e, 2003'de %24'e çıkmış, 2007

yılında ise %11 olarak bildirilmiştir. *E. faecalis* 'lerde ise %5'in altındadır (Werner ve ark., 2008) (Şekil 7).



Şekil 7. Avrupa’da VR *E. faecalis* prevalansı (EARSS 2008)

Türkiye’de ilk vankomisin dirençli *E. faecium* suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi’nden Vural ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu suş malign histiyositozis tanısı almış, bronkopulmoner enfeksiyonu olan bir bebekte plevra sıvısından izole edilmiştir. Bunu aynı yıl içerisinde diğer merkezlerden yapılan bildirimler takip etmiştir (Vural ve ark., 1999).

CDC’nin alt komitesi olan “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)” 1995 yılı ortalarında VRE’lerin hızlı yükselişini önlemek ve kontrol altına almak üzere bir ek rehber yayınlamak zorunda kalmıştır. Buna rağmen VRE’lerde artış trendi sürmüştü, insidans oranındaki artış mortalite oranlarına da

yansımış ve VRE'ye bağı enfeksiyonların mortalitesi 2 kat artarak %36'lara kadar yükselmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000).

Enterokok kökenli hastane enfeksiyonlarının insidansında görülen dramatik artışlarda, hastanelerde üretilen hizmetin kalitesi ve bağı olarak yatış endikasyonu alan hastaların özelliklerinin de etkili olduğı gösterilmiştir. Altta yatan ciddi bir hastalığı olan veya immunsuprese hastalar, kanser kemoterapisi alanlar veya transplantasyon hastaları, intra abdominal veya kardiyotorasik cerrahi uygulanan hastalar veya vankomisin, III. kuşak sefalosporinler, karbapenemler ve 5-nitroimidazol türevleri gibi geniş spektrumlu antimikrobiyal kullanım zorunluluğı olan hastaların kabul edildiğı, komplike tanı ve tedavi girişimlerinin uygulandığı hastanelerde enterokok enfeksiyonlarının insidansı küçük ve orta ölçekli şehir hastanelerine oranla oldukça yüksektir. Mesela transplantasyon için bekleyen hastalarda endojen florada VRE taşıyıcılık oranı %3,4 iken; transplantasyon sonrası hastalardaki VRE oranının %44'e çıktığı bildirilmiştir (Bakir ve ark., 2001).

Hastanelerde el yıkama alışkanlığının ve diğ enfeksiyon kontrol önlemlerinin istenen seviyeye çıkarılamaması, kolonizasyon ve irrasyonel antibiyotik kullanımının kontrol altına alınamaması glikopeptid dirençli enterokokların hastane enfeksiyonlarındaki artışını sürdürmesine yol açacaktır (Başustaoğlu, 2004).

VRE veya GRE (glikopeptid resisten enterokok) insidansındaki artışın bir diğ önemli sebebi, Avrupa'da kümes hayvanlarının rasyonlarına gelişim faktörü olarak eklenen avoparsin gibi glikopeptit türü antibiyotiklerdir. Avrupa ülkelerinin çoğunda çiftlik hayvanları, tavuk cesetleri, diğ et ürünleri ve atık su örneklerinde *vanA* tipi VRE ciddi problem haline gelmiştir. Bu zengin rezervuar çeşitliliğı gıda zinciri ile insanlara da yansımış ve toplumda VRE kolonizasyon oranı %2-12 olarak bulunmuştur. Ancak 1994 yılından itibaren bir çok ülkede avoparsin kullanımının yasaklanması ve hastalarda glikopeptit grubu antibiyotiklerin kısıtlı kullanımı sonucu bu ülkelerden bildirilen VRE oranlarında azalma tespit edildiğı bildirilmiştir (Borgen ve ark., 2001; Boogard ve ark., 2002; Alp ve Şardan, 2008).

Antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra 1950'li yıllarda çiftlik hayvanlarında ve özellikle tavuklarda büyümeyi destekleyici etkileri fark edilmiştir. Önceleri hemen hemen tüm antibiyotikler bu amaçla kullanılmış ancak

bunların bir kısmı büyümeyi etkilememiş, bir kısmı ise yüksek maliyete neden olmuştur. Büyütme faktörü olarak kullanılan dozlar subterapötik olarak tanımlanmaktadır, ancak bu dozlar bakteriler için subinhibitör dozlar değildir. Bu nedenle dirençli suşların seleksiyonuna neden olabilmektedirler. ABD’de kullanılan tüm antibiyotiklerin yaklaşık %85’i tedavi dışı amaçlar için hayvanlarda kullanılmaktadır. Avrupa’da ise bu oran %35 civarındadır. Bu amaçla kullanımı sonucunda büyüme %4-8 artmaktadır. Büyütme faktörü olarak etkilerini açıklayabilecek dört hipotez geliştirilmiştir;

1. Besinler bakteriyel yıkıma karşı korunmaktadır.
2. İnce bağırsak bariyerinin azaltılmasına bağlı olarak emilim artmaktadır.
3. Antibiyotikler intestinal florada bulunan bakterilerin toksin üretimini azaltabilmektedir.
4. İntestinal enfeksiyonlarda azalma meydana gelmektedir.

Geçmişte veya günümüzde büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotiklerin çok az bir kısmı detaylı olarak araştırılmıştır. Bu antibiyotiklerin önemli bir kısmı insanlarda tedavi amaçlı olarak kullanılmakta olduğundan indirekt olarak bazı bilgilere sahip durumdayız. Bambermisin, basitrasin, monensin, salinomisin, virginiamisin, tylosin, spiramisin, avilamisin, avoparsin, ardasin, efrotomisin, olakuindoks, karbadoks büyütme faktörü olarak kullanılmış antibiyotiklerdir. Karbadoks ve olakuindoks dışında büyütme faktörlerinin spektrumu Gram-pozitif bakterilerle kısıtlıdır. Gram-pozitif bakterilerde direnç sorunu ortaya çıktıkça bu alanda araştırmalar da artmaktadır. Hayvanlar ve insanlarda hastalık etkeni veya normal flora bakterileri arasında direnç determinantlarının genetik yollardan transferinin kanıtlanmış olması bu konuya olan ilgiyi arttırmıştır. Antibiyotik katkılı hayvan yemlerinin yaygın kullanımının, enfeksiyonları azalttığına dair bulguların çok az olmasına rağmen tam tersi olarak antibiyotik direncini arttırdığına dair yeterli bulgu mevcuttur. Ancak esas korkutucu tarafı bu direncin genetik transfer yoluyla yayılabilmesidir. VanA tipi transposon Tn-1546 ile kodlanan direnç hayvanlar arasında VRE’nin klonal gelişimini hızlandırmış ve sonuçta VRE’ler gıda zinciri ile insana bulaşarak gastrointestinal kolonizasyonu artırmışlardır (Lemcke ve Bülte, 2000; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı değişik mekanizmalarla direnç geliştirmeleri ve genetik olarak dirençli suşların ortaya çıkması, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Hayvanlarda kullanılan bu antibiyotiklerin etki spektrumları, farmakolojik özellikleri ve etki mekanizmaları insanlarda kullanılanlarla benzerlik gösterebilmektedir (Lemcke ve Bülte, 2000; Emborg ve ark., 2003; Hayes ve ark., 2004)

Antibiyotiklerin bu amaçla kullanımları 1960'lı yıllarda tartışılmaya başlanmış, insan ve hayvan kaynaklı bakterilerde direnç sorununu ortaya çıkaracağı savunulmuştur. İlk olarak Avrupa ülkesi Danimarka da broylerler de antimikrobiyal olarak kanatlı yetiştirme yemlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (Emborg ve ark., 2003). Gıda kaynaklı ve çoğul dirençli Salmonella enfeksiyonlarının 1960'lı yıllarda ortaya çıkması, İngiltere'de 1968 yılında Prof. Michael Swann başkanlığında bu konuda çalışacak bağımsız bir komitenin kurulmasını zorunlu kılmıştır. Komitenin yayınladığı Swann raporunda, insan ve hayvanlarda terapötik amaçla kullanılmayan veya çok az kullanılan antibiyotiklerin, dirençli suşların gelişmesine neden olarak insanlarda klinik kullanımdaki ilaçların etkinliğini ortadan kaldıracadığından; büyütme faktörü olarak antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması gerektiği vurgulanmıştır. Özellikle penisilinlerin, tetrasiklinlerin, tylosinin ve sülfonamidlerin reçetesiz kullanımının durdurulması önerilmiştir. Yemlerde kullanımına onay verilen antibiyotiklerde; önemsenecek düzeyde üretime katkısı olması, insan ve hayvan sağlığına tehlikeli etkisi olmaması, konsantrasyon düzeyinin kontrol edilebilir olması, hayvanların tedavisi için kullanılan dozlara ulaşmaması, tıp ve veteriner hekimlikte tedavi maksatlı kullanılmaması gibi özelliklerin aranması koşulu getirilmiştir. Ancak daha sonra görev alan birçok hükümet bu kuralları hafifletici kararlar almış ve uygulamışlardır. Danimarkada, 1970 yılında yapılan araştırmalarda broyler üretim çiftliklerinde antimikrobiyal yetiştirme preparatlarının yemlerde kullanımının yaygın şekilde devam ettiği bildirilmiştir (Emborg ve ark., 2003). Bu özellikler Avrupa'da birçok ülkede kullanılmakla birlikte, 1975 yılında Avrupa Birliği makrolid grubunda olan spiramisin ve tylosinin büyütme faktörü olarak kullanılmasına onay vermiştir. Bunun sonucu olarak, kısa bir süre sonra domuzlardan izole edilen *Enterococcus spp.* ve *Campylobacter spp.* izolatlarında makrolid direnci ortaya çıkmıştır. Avrupa Birliği aynı şekilde vankomisinin insanlarda klinik kullanıma girdiği 1970'li yıllarda, bir

glikopeptid türevi olan avoparsinin sığırlarda büyütme faktörü olarak kullanımına onay vermiştir. Swann raporunun aksine görüşler ortaya atılmış ve Walton 1988 yılında bu antibiyotiklerin subletal veya subinhibitör konsantrasyonlarda kullanımının dirençli bakteri popülasyonlarının seleksiyonuna neden olmayacağını ileri sürmüştür. Ancak daha sonraki yıllarda avoparsin, virginiamisin ve tylosinin yasaklanması sonrasında yayınlanan birçok araştırma, bu görüşün son derece yanlış bir yaklaşım olduğunu kanıtlamıştır.

Birçok araştırmacı, hayvanlardan izole ettikleri enterokok türlerinin antibiyotik dirençlilik durumlarını araştırmışlardır. Önemli bir sebep, hayvanlarda antimikrobiyal ajan kullanımının miktarıdır. FEDESA (European Federal of Animal Health) göre, 1997 yılında Avrupa antimikrobiyal satışı 3.949 ton olmuş hayvan sağlığı için ve 1599 ton büyüme promotorları satılmıştır. Diğer kritik kullanım ise profilaktik amaçlı su ve yemlerde antimikrobiyal kullanılmasıdır. En yaygın olarak domuz, brouler ve insanlardan izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri olmuştur. Bunların en çok kloramfenikol, makrolid, kanamisin, streptomisin ve tetrasikline direnç gösterdiği vurgulanmıştır (Devriese ve ark., 1996).

İnsan ve hayvan sağlığı için kullanılan antibiyotiklere karşı direnç dünya genelinde yaygın olarak tespit edilmiştir. Son yıllarda direnç görülme gelişim oranları hızlanarak artmıştır. Bugün gelinen noktada multiple direnç global bir problem haline gelmiştir. Modern kanatlı endüstrisinde antibiyotiğin hem tedavi hem de koruyucu amaçlı, bununla birlikte rasyonda (AMGPS) antimikrobiyal yetiştirme promotoru olarak kullanılmaya başlaması bu büyük problemi arttırmıştır. Hollanda'da 1990 yılında insanlarda 80.000 kg, hayvanlarda 300.000 kg antibiyotik olarak ilacın kullanıldığı belirlenmiştir. Bu iki popülasyonun da kg/100 mg aktif ilaç kullanıldığı hesaplanmıştır. Bunun %26'sının veteriner hayvan sağlığında kullanıldığı belirlenmiştir. Özellikle brouler yetiştiriciliği yapılan kanatlı işletmelerinde bu oranın yaygın olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Kanatlılar için kg/yıl/430 mg şeklinde antibiyotiğe maruz kaldıkları hesaplanmıştır. Bu sonuçlar diğer gıda üretilen hayvan popülasyonları ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir antibiyotiğe maruz kalışı temsil eder. Terapötik olarak kullanılan antibiyotik kadar AMPG olarak verilen antibiyotik oranlarının benzer olduğu belirlenmiştir. Kanatlılarda bu kadar yüksek antibiyotik kullanımı belki kabul

edilebilirdir, ancak insan sağlığı için önemli bir tehlike olarak görülmektedir. Antibiyotikler hem patojen bakterilerde direnç için hem de hayvanlarda florayı etkileyen bir tehlike olması bakımından önemlidir. Enterokoklar insanlar ve hayvanların kendi florasında bulunan önemli bir bakteridir. Bu bakteriler sefalosporin, penisilinaz dirençli penisilinlere linkomisin ve aminoglikozidlere intrinsik dirençli olabilirler (Boogard ve ark., 2002). Multi resistant enterokok ve stafilokok enfeksiyonlarında tedavi amaçlı glikopeptit olarak vankomisin kullanılmaktaydı, ancak VRE belirlenmesi ile birlikte bu konudaki endişeler de artmıştır. VRE, 1993 yılında ilk olarak hastane dışı kaynaklardan izole edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dışında birçok ülkede avoparsin ile vankomisin ve diğre glikopeptitler arasında cross direnç olduğu da bildirilmiştir. Danimarka, Almanya ve Norveç’te 1995 yılında yapılan çalışmalarda erişkin hayvanların bulunduğu çevrede VRE varlığı ile avoparsin arasındaki ilişki doğrulanmıştır. Bunun sonucu olarak avoparsin Norveç ve Danimarka’da 1995 yılında ve Almanya’da 1996 yılında kullanımı yasaklanmıştır. 1997 yılında avoparsin Roche vitaminler adındaki ticari preparatının satımını yasaklamıştır (Borgen ve ark., 2001).

Danimarka’da 1960 yılında broylerlerde antimikrobiyal olarak kanatlı yetiştirme faktörü kullanılmaya başlanmıştır. Danimarka’da broyler üretim yerlerinde yaygın olarak 1970’li yıllarda kullanılmaya devam edilmiştir. Bu kullanım 1995 yılında diğre hayvan türlerinde de yayılmıştır. Avilamisin 1400 kg, avoparsin 1100 kg, virginiamisin 1090 kg, basitrasin 610 kg, spiramisin 507 kg ve flavofosfolipol 48 kg yem katkı maddesi olarak toplamda Danimarka’da kullanılmıştır. 172.900 ton kanatlı etinin bu kullanım periyodu içerisinde üretildiği belirlenmiştir (Emborg ve ark., 2003).

Epidemiyolojik bir çalışmada, broyler çiftliklerinde avilamycine-dirençli *E. faecium*’un varlığı ve büyütme yemi olarak avilamycine kullanımı arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak ortaya konulmuştur. Flouroquinolonlar ve glycopeptidler araştırmacıların en çok üzerinde durduğu antimikrobiyal ilaçlar olmuştur. Her iki tip ilaç insanlarda hayatı tehdit eden birçok enfeksiyonun tedavisinde ilk sıralarda kullanılmaktadır. Flouroquinolonlar 1990 yılında veteriner hekimlik sahasında kullanılmaya başlanmıştır. Avoparcin gibi glycopeptidler ise Avrupa’da hayvan sağlığında geniş çaplı kullanılmıştır. Borgen ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada avoparcin kullanımının kanatlılarda vankomisin dirençli enterokokların gelişmesinde

önemli bir etken olduğunu rapor etmişler. Bu araştırmacılar Hollanda da avoparcin kullanımının yasaklanmasından iki yıl sonra VRE'nin oranında önemli bir düşüş olduğunu tespit etmişler. Hayvanlarda bulunan resistant bakteriler, direkt kontakt ve hayvansal gıdalar ile insanlara bulaşabilir. Resistant bakteriler insanlarda kolonize olabilir ve direnç genlerini diğer kommensal bakterilere aktarabilir. Kanatlılardan insanlara bulaşma noktasında çalışmalar devam etmektedir. Eğer insanlar hastanede VRE maruz kalmamışlarsa dışarıda maruz kalma durumları daha muhtemel olarak düşünülür (Aarestrup ve ark., 2000).

Sadece hayvan yemlerinde kullanılan bir glikopeptid olan avoparsin, terapötik olarak insanlarda kullanılan ve aynı gruptan olan vankomisine ve teikoplanine çapraz direnç oluşturmaktadır. Bates ve ark. (1994), hayvanlardan vankomisine dirençli enterokok (VRE) izolasyonunu rapor ederek bu konuya dikkat çekmişlerdir. Avrupa'da besi hayvanlarında saptanan VRE'ler tamamen avoparsin kullanımından kaynaklanmaktadır. Danimarka'da 1995 yılında kümes hayvanları ve domuzlarda avoparsin ve VRE'lerin saptanması üzerine, üreticilerin de ortak isteği ile aynı yıl avoparsinin kullanımı yasaklanmıştır. Bu yasaklamaya, avoparsinin vankomisin ile çapraz dirençli olması, direncin transfer edilebilmesi, VRE'lerin seleksiyonuna neden olması ve bu dirençli suşların gıdalar yoluyla insanlara aktarılması gibi nedenlere dayalı olarak karar verilmiştir. Aynı yıl Norveç, bir yıl sonra Almanya ve 1997 yılında tüm Avrupa Birliği bu kararı uygulamışlardır (Başustaoğlu, 2004).

Bununla birlikte Almanya'da yapılan çalışmalarda insanlarda vankomisin dirençli *E. faecium* oranlarının 1994 yılında %13 olarak belirlenmiştir. Almanya'da 1996 yılında avoparcin kullanımının yasaklanmasını takiben yapılan çalışmalarda 1997 yılında bu oranın %4'e düştüğü belirlenmiştir. Benzer olarak İtalya'da VR *E. faecium* oranlarında düşüşler belirlenmiştir. Buna paralel olarak Hollanda'da yasaklanma sonrası 1997-1999 yılları arası insan, broyler ve domuzlarda VR *E. faecium* oranlarında benzer düşüşler olduğu tespit edilmiştir (Aarestrup ve ark., 2001).

Farklı ilaçlara karşı görülen direnç oranları takibinde de aynı sonuçlar görülmüştür. Broylerlerden izole edilen *E. faecium* izolatlarında virginiamisin kullanımının sınırlandırılmasından sonra 1997 %76,7 olan eritromisin direncinin 2000

yılında %12,7'ye düştüğü belirlenmiştir. Virginiamisin kullanımının yoğun olduğu 1995 ve 1997 yılları arası *E. faecium* izolatları arasında eritromisin direncinin 1995 yılında %27,3 ve 1997 yılında %66,2 olduğu tespit edilmiş ve bu oran artışı önemli olarak değerlendirilmiştir (Aarestrup ve ark., 2001).

Hollanda'da yapılan bir çalışmada broylerlerde avoparsin kullanımının durdurulmasından sonra VR *E. faecium* izolasyonu %80 iken bu oranın 1999 yılında %31'e düştüğü belirlenmiştir. Fransa'da yapılan bir çalışmada broylerlerden toplanan dışkı örnekleri, 1999 ve 2000 yılının ilk yarısında toplanmıştır. AGPS spiramisin, tylosin, basitrasin ve virginiamisin Avrupa Birliği'nde kullanımının yasaklanmasından önce ve sonrasında örnekleme yapılmıştır. Eritromisin ve virginiamisin 1999 yılında sırasıyla %59 ve %49,2 iken 2000 yılında %45,7 ve %18,8 oranlarında düştüğü çalışmalarda tespit edilmiştir. Norveç'te, çalışmalar çok duyarlı izolasyon metotları üzerine temellendirilmiştir. Sonuç olarak avoparsinin yasaklanmasından sonra 1,5 ve 3 yıl içerisindeki periyotta vankomisin dirençli *E. faecium* izolasyonu avoparsinin önceden yem katkı maddesi olarak kullanıldığı çiftliklerde %96, %98 ve %99 olarak tespit edilmiştir. Danimarka'da yapılan benzer bir çalışmada; avoparsinin kullanımının yasaklanmasından 5 yıl sonra VRE prevalansı selective metot kullanarak 0,74 (104/140), nonselective metot kullanarak 0,12 (17/140) olarak tespit edilmiştir. AGP dirençli *E. faecium* izolatlarının avilamisin, eritromisin ve virginiamisin dirençlilik oranları sırasıyla 0,91, 0,92 ve 0,84 olarak avilamisin-viriginiamisin antimikrobiyel gıda katkı maddelerinin kullanıldığı broyler çiftliklerinde belirlenmiştir (Emborg ve ark., 2003).

Avoparcin yem katkı maddesi olarak kullanıldığı büyük hayvan çiftliklerinde özellikle buzağların dışkı örneklerinden Enterokok izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir. En sık olarak *E. avium*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. hirae* izole edilmiştir. Süt ineklerinde yapılan enterokok taramasında ise daha az tespit yapılmıştır. Aynı araştırmacılar kanatlı intestinal örneklerinde yine yüksek oranda enterokok izolasyonu yaptıklarının bildirmişler (Devriese ve ark., 1996).

Watts ve ark. yaptıkları bir çalışmada memelilerin vücut bezlerinde enterokok izolasyonu yaptıklarını bildirmişler ve bu enterokokların penisillin, kloksasilin,

sepharine, seftiofura, novobiosine, enrofloksasine, eritromsine ve pirlymisine dirençli olduklarını tespit etmişlerdir (Watts ve ark., 1995).

Yine aynı şekilde Danimarka streptogramin dirençli enterokokların seleksiyon riski ve insanlarda klinik kullanıma giren kuinupristin/dalfopristine karşı oluşacak direnci önlemek amacıyla virginiamisin'in büyütme faktörü olarak kullanımını yasaklamıştır. Tüm bunların sonucu ve klinik kullanımda olan antibiyotiklerin etkinliğini korumak ve direnç gelişiminin önüne geçmek için Avrupa Birliği 1999 yılında avoparsine ek olarak virginiamisin, basitrasin, tylosin ve spiramisin'in büyütme faktörü olarak kullanımını yasaklamıştır. Benzer şekilde avilamisin ile insanlarda klinik kullanımda olan everninomisin arasında 1998 yılında çapraz direnç saptanmış, bunun üzerine üretici firma everninomisini klinik kullanımdan çekmiştir (Başustaoğlu, 2004).

Avrupa Birliği'ne aday bir ülke olarak Türkiye'de Avrupa Birliği'nin antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımı konusundaki yasaklama kararlarını uygulamış ve 1997 yılından itibaren bu ajanların kullanımını yasaklamıştır. Antibiyotiklerin hayvancılıkta büyütme faktörü olarak kullanımının yanında tedavi ve profilaktik amaçlı kullanımı sürmektedir. Tarım ve Köyişleri ile Sağlık Bakanlığı'nın birlikte çıkardıkları "Türk gıda kodeksi hayvansal kökenli gıdalarda veteriner ilaçları maksimum kalıntı limitleri tebliği" (Tebliğ no: 2002/30, Tarih 28.04.2004-24739) ile et, süt, yumurta, bal gibi hayvansal kökenli tüm gıdalarda bulunabilecek enfeksiyon tedavisi/profilaktik amaçlı kullanılan antibiyotiklere ait farmakolojik aktif maddelerin maksimum kalıntı limitleri yayınlanmıştır. Ancak ne yazık ki bu konuda gerektiği şekilde kontrol uygulaması yapılamamaktadır. Örneğin; gelişme döneminde antibiyotikli yemle beslenen hayvanların kesimden yedi-on gün önce antibiyotiksiz yeme geçme zorunluluğu vardır. Bu dönemde enfekte olan hayvanların imhası ve enfekte hayvanlardan elde edilen ürünlerin satışa sunulmaması gerekmektedir. Meydana gelebilecek maddi kaybı en aza indirmek için antibiyotiksiz yem dönemi kısa tutulmakta ve kesim sonrası yeterli düzeyde kalıntı kontrolü yapılamamaktadır. Yine tavuk üretiminde kümeslerde metre kareye düşen kilo miktarı arttığı zaman, antibiyotikli yemleme döneminde kümesteki hayvanları seyreltmek amacıyla erken kesimler yapılmakta ve bu hayvanlardan elde edilen etler satışa sunulabilmektedir (Başustaoğlu, 2004).

Yeni Zelanda'da broylerlerde %82 oranında VRE izole edilmiş, izolatların tamamının *vanA* taşıyan *E. faecalis* olduğu tespit edilmiştir. Yeni Zelanda, avoparcin kullanımını 2000 yılında yasaklanmıştır (Manson ve ark., 2004). Tayvan'da, 1977-2000 yılları arası yaygın kullanılan avoparsin 2000 yılında yasaklanmıştır (Lauderdale ve ark., 2007).

ABD kıtasında VRE oranı sağlık merkezlerinde %33 olarak belirlenmişken Avrupa ve Kuzey Amerika'da bu oranın %13-28 arasında değiştiği bildirilmiştir (Hidron ve ark., 2008). Tür düzeyinde yapılan çalışmalarda, vankomisin dirençli *E. faecium* oranları Fransa'da %0,8 ve İtalya'da %24 oranında iken, Amerika kıtasında bu oranların %80 olduğu belirlenmiştir (Frye ve Jackson, 2013). Amerika Birleşik Devletleri'nde, 1997 yılına kadar kümes hayvanlarında ve hastaneye yatış öyküsü olmayan kişilerde yüksek düzey dirençli (MİK>32 mg/L) VRE tespit edilmemiştir. Oysa Almanya'da, 1994 yılında, sağlıklı insanların %12 sinde VRE taşıyıcılığı bulunmuştur (Aktaş ve Derbentli, 2009). Bu farkın ABD'de hayvan yemlerinde glikopeptit grubu antibiyotik kullanılmamasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu sebeplere dayanarak ABD'de VRE kökenli hastane enfeksiyonlarında en önemli rezervuarın endojen florasında kolonizasyonu olan hastalar olduğu tespit edilmiş ve VRE ile kolonize hastaların takip amaçlı kültürlerle izlemleri önerilmiştir (McDonald ve ark., 1997; Aktaş ve Derbentli, 2009). ABD'de hastanelerde glikopeptid türevi antibiyotiklerin kullanımının daha fazla olması sebebi ile VRE'lerin hastane enfeksiyonlarındaki insidansları Avrupa ülkelerine göre oldukça yüksek bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada ilk defa hayvan kaynaklı bir Vankomisin dirençli enterokok izole edilmiştir. Domuzdan izole edilen bu bakterinin *E. faecium* olduğu ve *vanA* geni taşıdığı ancak diğer direnç genlerini taşımadığı tespit edilmiştir (Donabedian ve ark., 2010; Frye ve Jackson, 2013).

Antibiyotiklerin büyütme faktörü olarak kullanımı hayvanlarda normal florada bulunan bakterilerde direnç gelişimine neden olmakta ve dirençli olan bu bakterilerin bir kısmı da insanlar için patojen olabilmektedir. Hayvanlardan kaynaklanan enfeksiyon etkenleri oldukça fazladır ve insanlarda enfeksiyon etkeni ajanların yaklaşık yarısının hayvan rezervuarı mevcuttur. Ayrıca, yeni tanımlanan enfeksiyonların yaklaşık 3/4'ü

zoonotik enfeksiyonlardır. Bunların da bir kısmı besin kaynaklı, bir kısmı vektör kaynaklı, bir kısmı ise direkt temas yoluyla bulaşmaktadır.

Önemle üzerinde durulması gereken diğer bir direnç sorunu da enterokoklarda vankomisin direncidir. Bu antibiyotik ile aynı gruptan olan avoparsinin büyütme faktörü olarak hayvan yemlerinde kullanımı *Enterococcus faecium* izolatlarında direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Dirençli enterokokların hayvanlardan insanlara geçişi kanıtlanmıştır ve bu ajanların kullanıldığı hayvanlar önemli rezervuar oluşturmaktadır. Schouten ve ark. (1999) Hollanda’da yaptıkları bir çalışmada, vejetaryenleri ve vejetaryen olmayanları VRE taşıyıcılığı açısından karşılaştırmışlardır. Vejetaryenlerde VRE taşıyıcılığı saptanmazken, vejetaryen olmayanlarda VRE taşıyıcılığını yaklaşık %20 olarak saptamışlardır. Ayrıca, moleküler tiplendirme metotları ile yapılan çalışmalarda, hayvan izolatları ile insan izolatları arasında yüksek düzeyde çeşitlilik gözlenmekle birlikte insan ve hayvan izolatlarında benzer ve ilişkili suşlar saptanmıştır. Hem insan hem de hayvan izolatlarında *vanA* geni *Tn1546* transpozonu üzerinde yer almaktadır. Bu gen enterokoklar arasında veya *Staphylococcus aureus*’a kolaylıkla transfer edilebilmektedir. Elde edilen hayvan kaynaklı izolatlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile yapılan sekans analiz çalışmaları ile 13 farklı tip saptanmıştır. Bunlar arasında önemli farklılıklar belli bölgelerde insersiyon ve delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu farklılıklar özellikle kümes hayvanlarında G varyantı, domuzlarda ise T varyantı şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Her iki tipin de insan izolatlarında saptanması ve domuz tüketiminin olmadığı müslüman ülkelerde insan kaynaklı izolatlarda T varyantına rastlanmaması, VRE’lerin hayvanlardan insanlara geçişi hipotezini kanıtlamaktadır. Bir glikopeptid antibiyotik olan avoparsin Danimarka’da 1995 yılında yasaklanmıştır. Kümes hayvanlarında 1994 yılında %100 olan VRE pozitifliği 1997 yılında %25’e, toplumda VRE taşıyıcılığı 1994 yılında %12 iken 1997 yılında %3’e düşmüştür. Tüm bu sonuçlar bize insan kaynaklı izolatlarda saptanan direnç üzerinde hayvansal gıda tüketiminin etkisini ortaya koymaktadır.

ABD’de avoparsinin hayvancılıkta kullanımına Avrupa’nın aksine hiçbir zaman izin verilmemiştir. VRE taşıyıcılığına bakıldığında; avoparsinin kullanımına bağlı olarak ABD’de toplumda sağlıklı kişilerde neredeyse sifıra yakınken, Avrupa’da bu oran %28-33 arasında değişmektedir. Ancak hastanelerde saptanan VRE olguları tam

tersine ABD’de oldukça yüksek oranda saptanırken, Avrupa’da bu oran oldukça düşüktür. Bu farklılık ABD’de hastanelerde tedavi seçeneği olarak ampisiline direncin çok yüksek olması nedeniyle vankomisin kullanımının çok fazla olması, Avrupa’da ise ampisilin direncinin %33 civarında ve hala bir tedavi seçeneği olması nedeniyle vankomisin kullanımının düşük düzeyde olmasına bağlanmaktadır.

İnsanlarda ilk VRE saptanmasından yaklaşık 10 yıl sonra VRE’lere etkili ve streptogramin grubundan olan kuinupristin/dalfopristin klinik kullanıma girmiştir. Aynı gruptan olan virginiamisin uzun yıllardır Avrupa ülkelerinde ve ABD’de özellikle kümes hayvancılığında büyütme faktörü olarak kullanılmıştır. Direnç konusunda virginiamisinin kullanımından önce bu konuda yeterli veri olmadığı için günümüzdeki veriler ile karşılaştırma olanağına sahip değiliz. Virginiamisin ve kuinupristin/dalfopristine karşı dirençten sorumlu *satA* geni hayvan ve insan izolatlarında saptanmış ve bu genin invivo şartlarda dirençli *E. faecium* suşlarından duyarlı suşlara transferi gösterilmiştir.

Vankomisin-avoparsin ve kuinupristin/dalfopristin-virginiamisin arasındaki ilişkiye benzer bir durum everninomisin ile avilamisin için söz konusudur. Danimarka’da yapılan bir çalışmada, *E. faecium* izolatlarında avilamisin direnci %69 olarak saptanmıştır. Diğer ülkelerden elde edilen benzer sonuçlar everninomisinin klinik kullanımının kısıtlanacağını göstermektedir (Başustaoğlu, 2004).

Geçen yıllarda enterokok ve *E. coli* (memeli hayvanlar) gibi kommensal flora bakterilerinde antibiyotik direnci büyük bir endişeye sebep olmuştur. İnsanlar aktiviteleri gereği yaban hayatla kontak kurarlar. Yabani hayvanların barsak florasındaki bakterilere bu ortamlarda maruz kalırlar. Bakteriler antibiyotik direnci gösteren profile sahip olabilirler. Örnek olarak av kuşlarının avlanması sırasında insanlar yabani hayvanların mikroflorasıyla kontak kurabilirler. Birçok yabani kanatlılar arasında antibiyotikle tedavi edilmemelerine rağmen yabani yaşam içerisinde antibiyotiğe dirençli bakterilerin önemli taşıyıcısı olarak bilim insanları tarafından kabul edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda görüldü ki; farklı yabani hayvanlarda antibiyotiğe maruz kalmamalarına rağmen antibiyotiğe dirençli bakteriler tespit edilmiştir. Dahası yabani kanatlılarda bakterilere direnç genlerinin taşınması sonucu

kanatlı yetiştirme çiftliklerinde ve insanlarda dirençli bakterilerin oranının artmış olduğu sonucuna varılmıştır (Santos ve ark., 2013).

Avoparsin bir glikopeptit antibiyotik olarak Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve birçok ülkede gıda üretilen hayvanlarda büyütme faktörü olarak kullanılmaktadır. İnsan sağlığında, glikopeptit dirençli enterokoklar (GRE) nozokomiyal enfeksiyonların artan bir problem haline gelmesinde önemlidir. GRE hayvansal gıda zinciri üzerinden insanlara transfer olması mümkündür (Yoshimura ve ark., 1998).

Bogard ve Stobberingh (2000) Hollanda'da yaptıkları epidemiyolojik çalışmada; insan ve hayvanlar arasında antibiyotiklerin direnç ilişkilerinin epidemiyolojisini ortaya koymuşlardır. Dirençli bakterilerin yayılımı ve bu konudaki endişeler antibiyotik kullanımının yan etkileriyle kaçınılmaz hale gelmiştir. Birçok çalışmada antibiyotik kullanımının sonucu olarak hem patojenik bakterilerde hem de kommensal bakterilerde direnç artışı şekillenmiştir. Kommensal bakteriler patojenik bakteriler için direnç genleri rezervuarları olarak görev yapmaktadır. Direnç oranları için antibiyotik kullanımında seçici davranmanın önemli bir belirleyici olduğu bilim insanları tarafından ortaya konulmuştur. Gıda üretilen hayvanlar resistant bakteriler bakımından taşıyıcı olabilirler. Özellikle zoonotik bakteriler insanlara bulaşarak bu konuda ciddi problemlere sebep olabilirler. *E. coli* ve enterokoklar direnç özellikleri bakımından halen daha araştırmacılar tarafından gözlemlenmektedir. Örneğin hasta hayvanlar, hasta ve sağlıklı insanlarda *E. coli* ve enterokoklarda direnç prevalansı, resistant bakterilerin aktarılabilişliği ve hayvanlardan insanlara (ya da insanlardan hayvanlara) karşılaştırılabilir değerlendirmeler yapılmaktadır. Avoparsin kullanılmış ya da kullanılmaya devam eden ülkelerde sindirim sistemi kökenli enterokoklarda vankomisin direnç yaygınlığı araştırılmıştır. İnsan ve hayvanlar arasında bakteriyel direnç genlerinin transfer edilip edilmediği hem de dirençli suşların kolonizasyon yaygınlığı araştırılmıştır. Avrupa'da avoparsin kullanımının yasaklanması sağlıklı insanlarda, gıda üretilen hayvanların dışkı örneklerinde ve etlerde VRE'nin görülme oranının birçok Avrupa ülkesinde düştüğünü belirlemişlerdir. İnsanlara direncin aktarılmasında gıdalarda direnç aktörlerinin taşınmasının ve hayvansal gıdalarda bakteriyel direncinin gelişmesine sebep olan antimikrobiyellerin kullanılmasının altı çizilmiştir. Toplum sağlığının korunması için hayvanların resistant bakterilerinin yayılmasının ve ayrımının

yapılmasının önemli olduğu düşünülmüştür. Hayvan katkı maddesi olarak kullanılan AMGP rutin olarak uygulanmaya devam edilmemesine karar verilmiş ve bunun sonucunda Avrupa’da %30-50 oranında VRE azaldığı tespit edilmiştir. Dünya genelinde antibiyotik direncinin gelişim oranlarında artış büyük bir endişe uyandırmıştır. Antibiyotik kullanımındaki artış patojenik bakterilerdeki direncin artışına ve büyük risk haline gelişine neden olmuştur. Bu durum direnç genlerinin yayılması için de önem arz etmektedir. İnsan ve hayvanda antibiyotiklerle tedavi hem profilaksi hemde küratif tedavi için önemlidir. Avrupa’da yıllık tüm hayvanlar için antimikrobiyel ilaçların kullanımı %50 oranındadır. Bu antibiyotikler sadece hayvan sağlığında değil, aynı zamanda hayvansal yemlerde de gelişimi artırıcı yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Toplum üzerinde gıdasal kaynaklı etkilerin ve atık üretim oranındaki artışı da bu durumu etkilemiştir. Genel olarak Avrupa’da hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %30’u APE olarak kullanılmaktadır. Ancak ülke bazında bu oran değişiklik gösterebilir (Bogard ve Stobberingh, 2000).

Enterokoklarda artış önemli olarak kabul edilir çünkü insan hastane enfeksiyonlarında önemli bir etkidir. Avoparsin ile beslenen kanatlı ve domuzlarda VRE arasında bir korelasyonun olduğu Avrupa’daki araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Gıda üretilen hayvanlarda antibiyotiklerin fazla kullanılması, hayvanlarda direncin yüksek olan zoonotik patojenlerin oranını artırabilir. Antimikrobiyel dirençli enterokoklar insanlarla çiftlik hayvanlarıyla kontakt kurarak çevreye bulaştırılabilir. Avoparsin ile beslenen kanatlılarda vankomisin dirençli *E. faecalis* enfeksiyonu görülebileceği de rapor edilmiştir (Leme ve ark., 2000).

1997’de avoparsin kullanımı Avrupa Birliği’nde yasaklanmıştır. Hemen sonrasında VRE prevalansında düşüklük olduğu belirlenmiştir. *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* ve *vanM* olmak üzere 8 tane direnç geni (glikopeptit direnç geni) belirlenmiştir. *vanA*, *vanB* ve *vanM* glikopeptit genlerin plazmid temelli konjugasyon aracılığıyla enterokoklar arasında ve *S. aureus* gibi diğer Gram pozitif koklar arasında aktarılabilir olduğu belirlenmiştir. Yabani kanatların oluşturduğu popülasyonla ilişkili insan yaşam alanları ve duyarlılığın yüksek olduğu kümes alanları, antibiyotik dirençli bakteriler ile kolonizedir. İnsan ve evcil hayvanlardaki antibiyotik uygulamalarını düzenleyebilmek mümkündür. Kentlerde çöp yığınları üzerinde

beslenen karga ve martılar antibiyotik dirençli *E. coli* sıvıları ile kolonizedir. Martı ve kargalar önemli bir rezervuarı kabul edilirken çevre önemli bir vektör olarak kabul edilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yabani memeliler ve kuşlar enterokokal antimikrobiyal direnç gelişimi belirlenmiştir. Bu direncin antibiyotiğe maruz kalınmamasına rağmen geliştiği ortaya konulmuştur. İsviçre’de yapılan bir çalışmada ilk olarak VanA genotipinde bir VRE tespit edilmiştir (Oravcova ve ark., 2013).

## 2.7. Enterokokal Enfeksiyonlar

Vankomisin dirençli enterokok enfeksiyonu, lokalizasyon ile ilişkili semptom veya klinik bulguların eşlik ettiği pozitif VRE kültürünün varlığı olarak tanımlanabilir. İnsan ve hayvanlarda klinik örneklerden izole edilen suşların %80-90’ını *E. faecalis*, %5-10 kadarını ise *E. faecium* oluşturur. Son yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren *E. faecium* suşlarının hastane enfeksiyonlarında artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca nadir olarak *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. flavescens*, *E. avium* ve *E. hirae* gibi diğer enterokok türleri hastane ve hayvan enfeksiyonlarında klinik materyalden izole edilirken *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* ve *E. sulfureus* türleri ile PYR testi negatif olan ve atipik enterokoklar olarak adlandırılan *E. columbae*, *E. cecorum* ve *E. saccharolyticus* henüz insanlardan izole edilmemiştir (Butler, 2006; Doğru ve ark., 2010b; Bayram ve ark., 2011; Trivedi ark., 2011).

Enterokok türleri, insan ve hayvan gastrointestinal sisteminde yaygın olarak bulunurlar. Bu mikroorganizmalar, insan ve hayvanlarda antibiyotik direncinin gelişmesinde rol oynayan önemli ‘indikatör bakteriler’ olarak kabul edilirler. Enterokoklar çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdiği gerek intrinsik direnç özellikleri gerekse, mutasyon ve genetik madde aktarımı sonucu kazandıkları antibiyotik direnç özellikleri ve  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri ile her türlü ortamda canlılıklarını sürdürebilme yeteneklerinden dolayı nozokomiyal patojenler arasında yerlerini almıştır (Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Enterokoklar antimikrobiyel direnç genlerini ve bazı virulans faktörlerini mikrofloradaki diğer bakterilere aktararak nosokomiyal patojenlerin artışını sağlarlar (Borgen ve ark., 2001). Multi-drug resistant enterokoklar, insanlarda nozokomiyal enfeksiyonun en önemli patojen sebebi olarak artan bir şekilde identifiye

edilmiştir. Ancak nozokomiyal enfeksiyonların epidemiyolojik durumları hakkında son 10 yıldan fazladır çalışmalar olmasına rağmen, hastane dışında enterokoklarda antimikrobiyal direncin epidemiyolojisi ve prevalansı üzerine bilgiler sınırlıdır (Santos ve ark., 2013).

Enterokoklar insanların, kuşların, insektlerin ve memelilerin intestinal mikrofloralarında bulunan önemli bakterileridir. Nozokomiyal ve süper enfeksiyonlarda en yaygın rol oynayan ve ciddi enfeksiyonlara neden olan önemli fırsatçı patojenlerdir (Oravcova ve ark., 2013). Yıllar boyunca, önemli bir endokardit etkeni olarak üzerinde dikkatle durulan enterokoklar, 1970'li yılların ortalarında nozokomiyal enfeksiyon etkenleri olarak da önemli bir yer edinmişlerdir (Hershberger ve ark., 2005). Enterokokların insan ve hayvan bilhassa stres altındaki, immun sistemi zayıfladığı durumlarda, üriner sistem enfeksiyonları, endokardit, menenjit, bakteriyemi ve cerrahi yara enfeksiyonlarına sebep oldukları belirtilmiştir (Çöleri ve Çökmüş, 2008). Bu bilgiler 1990 yılından beri bilinmektedir (Lemcke ve Bülte, 2000; Doğru ve ark., 2010b). Enterokoklar, ABD'de bakteremi etkenleri arasında üçüncü sırada; nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu ve yara enfeksiyonu etkenleri arasında ise ikinci sırada yer almaktadır. Oppurtunistik patojen olan enterokoklar Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık olarak yapılan belirlemelerde yaklaşık %12'lik bir oranla stafilokoklardan sonra en çok nozokominal enfeksiyona neden olan ikinci etken olarak tanımlanmıştır (Alp ve Şardan, 2008). Enterokoklar fırsatçı patojenler olup beslenme ve bakım şartlarının uygun olmadığı hayvanlarda sepsisemi, üriner sistem enfeksiyonu, endokardit, ishal ve otitis eksternaya neden olabilirler. *E. faecalis*, *E. durans* ve *E. hirae* türleri kanatlılarda Pulmonary Hipertansiyon Syndrome, Amyloid Arthropathy, Bacteremia, Encephalomalacia, Neurological Disorders ve Endocarditis ile ilişkili enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiştir (McName ve King 1996; Tankson ve ark. 2001; Steentjes ve ark. 2002; Frye ve Jackson, 2013).

Amerika ve Avrupa kıtalarında yapılan çalışmalarda hayvanlardan insanlara gıda zinciri boyunca vankomisin dirençli enterokokların yayılması ve gentamisin direncinin yaygınlığı üzerine birçok bilgiye rastlanılmaktadır. Enterokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotik seçenekleri oldukça kısıtlıdır.  $\beta$ -laktam ve glikopeptid antibiyotiklerin bakterisidal etkisine enterokokların büyük çoğunluğu

tolerans gösterdiği için, endokardit ve menenjit gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde sinerjistik etkileşimle bakterisidal etkinlik elde edebilmek amacıyla aminoglikozidlerle kombine tedavi önerilmektedir. Söz konusu kombinasyondaki antibiyotiklerde birine direnç varlığında sinerjistik bakterisidal etki ortada kalkmaktadır (Alp ve Şardan 2008; Nam ve ark., 2013). 1999 yılının sonlarından beri ABD’de vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde kuinupristin/dalfopristin ile streptoGramin A ve B bir kombinasyon olarak kullanılmıştır. Kuinupristin/dalfopristin direnci klinik izolatlardan ve insan izolatlarından elde edilmiş *E. faecium*’larda var olduğu rapor edilmiştir (Boogard ve ark., 2002; Hayes ve ark., 2003).

Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid ve penisilin direncinin yanı sıra vankomisin direncinin de ortaya çıkmış olması, enterokoklara bağlı enfeksiyonların tedavisini daha da karmaşık hale getirmiştir. Dirençli enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanabilecek kısıtlı sayıda antibiyotik bulunmaktadır ve bunların etkinliği henüz tam olarak kanıtlanmamıştır. Her ne kadar, hastaların çoğunluğunun VRE ile sadece kolonize olması ve VRE’ye bağlı enfeksiyon oranlarının düşük olması rahatlatıcı bir tablo gibi gözükse de, kolonize/enfekte hasta oranının 10/1’e kadar yükseldiğini bildiren merkezler bulunmaktadır. VRE bakteremisine bağlı mortalite %60-70’e kadar yükselebilmektedir. Bununla birlikte, VRE bakteremisi ile vankomisine duyarlı enterokok bakteremisi arasında mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı da bildirilmiştir (Alp ve Şardan, 2008).

#### 1) Üriner sistem enfeksiyonları

Enterokokların sebep olduğu enfeksiyonların en sık görülen tipidir ve çoğu nozokomiyal kaynaklıdır. Hayvan ve insanlarda üriner sistemde VRE enfeksiyonları; sistit, piyelonefrit, prostatit ve perinefritik apse gibi klinik tablolarla seyredebilir. Üriner kateterizasyon en sık görülen risk faktörü olmakla beraber, üriner sistem anomalileri, cerrahi girişim ve antibiyotik kullanımında enterokokal risk faktörleri arasında yer alır (Lemcke ve Bülte, 2000; Zırakzadeh ve ark., 2006; Yıldırım, 2007; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

#### 2) Endokardit

Enterokoklar enfektif endokarditlerin *S. viridans* ve *S. aureus*’dan sonra en sık rastlanılan üçüncü önemli etkenidir. Bakteriyel endokarditlerin %5-15’inde

enterokoklar etkindir ve en sık *E. faecalis* görülür. Hastalık cerrahi yolla veya çeşitli manipulasyonlarla bakterinin gastro-intestinal sistemden veya çoğunlukla genitoüriner sistemden translokasyonu ile endojen kaynaklı subakut endokardit şeklinde başlar. Ayrıca intravenöz ilaç bağımlılarında da %5-53 oranında enterokokal endokardit görülebilir (Hayes ve ark., 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Nam ve ark., 2013).

### 3) Bakteriyemi

Enterokokal bakteriyemi, endokarditlerden daha sık görülen bir klinik formdur. Hastane enfeksiyonları içerisinde giderek artan öneme sahip olan VRE bakteriyemileri, hastane kökenli tüm bakteriyemiler içerisinde Avrupa'da 4. ABD'de ise 3. sıklıkta görülmektedir. VRE bakteriyemisi için risk faktörler, hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi veya parenteral beslenme, cerrahi girişimler, ciddi hastalıklar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, üriner kateterler, nötropeni ve mukozittir. Enfeksiyonlar sıklıkla nozokomiyal kaynaklıdır. Olguların %21-45'i polimikrobiyal olan bakteriyemiler de primer lokalizasyon sıklıkla üriner sistem veya karın içi enfeksiyonlardır. Ancak, pelvik enfeksiyonlar, termal yanık, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak gibi yaralar, arteriyel veya venöz kateterler ve kolanjit VRE'nin dolaşıma katılımını sağlayan diğer giriş yollarını oluştururlar (Lemcke ve Bülte, 2000; Alp ve Şardan, 2008; Frye ve Jackson, 2013).

Vankomisin dirençli enterokok bakteriyemisi olan hastalardaki mortalite oranı, popülasyona bağlı olarak değişir. Ototolog stem cell transplantasyonu yapılanlarda mortalite oranı %10 kadar düşük olmasına karşın, endokarditli hastalarda mortalite oranı %30'dan, solid organ tümörü olanlarda %50'den, ciddi hastalığı olanlar ve karaciğer transplant hastalarında %70' den fazladır (Yıldırım, 2007).

### 4) Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokoklar karın içi ve pelvik enfeksiyonlarda sıklıkla aerob ve anaerob mikroorganizmalarla beraber bulunur. Ancak bu enfeksiyonlarda enterokoklar sıklıkla göz ardı edilmekte ve hastalara enterokoklara etkisi olmayan antimikrobiyal tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Enterokoklar, nefrotik sendrom veya sirozlu hastalarda gelişen spontan peritonit ve periton dializi uygulanan vakalarda gelişen abdominal enfeksiyon veya intraabdominal abselerde tek mikroorganizma olarak izole edilebilmektedir. Ayrıca salpenjit, endometrit gibi peripartum maternal enfeksiyonlar ve

sezeryan sonrası apselerde de etken olabildikleri gösterilmiştir (Hayes ve ark., 2003; Alp ve Şardan, 2008; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

#### 5) Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokoklar nadiren selülit veya derin doku enfeksiyonlarına yol açarlar. Cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında diğer bakteriler ile birlikte izole edilebilirler (Danielle ve ark., 2005; Alp ve Şardan, 2008; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

#### 6) Menenjit

Enterokokal menenjit nadiren görülür ve genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, geçirilmiş beyin ameliyatları, kafa travması veya ventrikülo-peritoneal şant gibi predispozan faktörlerin varlığında ortaya çıkabilir. Ayrıca bakteriyemiler, AIDS ve akut lösemi gibi immünsüprese hastalarda da VRE menenjiti görülebilir. Etken diğer enterokok enfeksiyonlarında olduğu gibi sıklıkla *E. faecalis* olup daha seyrek olmak üzere *E. faecium*'dur (Çöleri ve Çökmüş, 2008; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

#### 7) Neonatal enfeksiyonlar

Enterokoklar yenidoğan için de önemli bir patojendir. Yenidoğanlarda erken ve general sepsise neden olur. Enfeksiyonların %77'den fazlası kateteri olan yenidoğan bebeklerde görülür. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde VRE'nin neden olduğu enfeksiyonlara bağlı nozokomiyal salgınlar bildirilmektedir. Enterokokkal suşların %82'si *E. faecalis*, %14'ü *E. faecium* olarak tespit edilmiştir. Enterokoklara bağlı üriner sistem enfeksiyonlarına yenidoğanlarda nadiren rastlanır (Hayes ve ark., 2003; Taşova ve İnal, 2004; Alp ve Şardan, 2008).

### 2.8. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Enterokoklar nozokomiyal enfeksiyonların önemli sebeplerinden olmaları ve sıklıkla çoklu ilaç direnci göstermelerinden dolayı; epidemiyolojik çalışmalar ve enfeksiyon kontrolünde bunların tip ve subtiplerinin belirlenmesine giderek artan oranda ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan başka enterokokal enfeksiyonların eksojen kazanım fikrinin desteklenmesi için de tiplendirme çalışmaları gerekmektedir. Özellikle

VRE'lerin artan sıklıkta görülmesinden dolayı, ilaç direnci gösteren enterokok suşlarının yayılması ile oluşan nozokomiyal salgınlara araştırılması major ilgi alanını oluşturmaktadır. Salgın araştırmalarının yanında; epidemiyolojik incelemelerde kullanılan metotlar, enterokokların farklı çevre/ konaklardaki yayılımı ve çoklu ilaç direnci gösteren suşların izlenmesinde de kullanılmaktadır. Önceleri enterokokal enfeksiyonların epidemiyolojik incelemeleri fenotipik özelliklerine göre yapılmıştır. Ancak bu yaklaşımlar bazen yararlı bilgiler sağlamasına rağmen, zaman alıcı olmaları, tekrarlanabilirliği, yorumlanması güç ve suşlar arasında ayırım yapmada yetersiz olmaları nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda geliştirilen moleküler tekniklerle beraber fenotipik yöntemlerin kullanımı yararlı bilgiler sağlayabilmektedir (Domig ve ark., 2003; Van Belkum ve ark., 2007; Santos ve ark., 2013).

Enterokokların ayırımında oldukça başarılı olan çeşitli moleküler tekniklerin gelişimi, epidemiyolojik yönden önemli bir anlayış getirmiştir. Ayırım gücü daha yüksek tiplendirme tekniklerinin kullanımı sonucu, insan ve hayvanlar arasında direkt ve indirekt temas ile eksojen olarak kazanılabilen suşların ayırımı mümkün olmaktadır. Dirençli enterokokların hastane içinde ve hastaneler arası yayılım gösterdiği de bildirilmektedir. Kültür doğrulaması ve direkt-saptama problemleri, nükleik asit amplifikasyon metodları, tanısal dizi analizi ve mutasyon tespiti, moleküler tiplendirme metodları, saptama yöntemleri gibi tanı prensipleri, mikrobiyolojik teşhis laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılır. Kullanılan ilk moleküler teknikler, plazmid profil analizi ve restriksiyon enzim analizi (REA)'dir (Domig ve ark., 2003). PFGE ile DNA restriksiyon endonükleaz (RE) profilinin belirlenmesi, enterokokal suşların ayırt edilmesinde olağanüstü yararlar sağlamaktadır. Multilokus enzim elektroforezi (MLEE), ribotiplendirme ve RAPD-PCR, hot-start PCR, nested PCR, broad-range PCR, arbitrarily primed PCR, ligaz zincir reaksiyonu, REP-PCR, multipleks PCR (mPCR), real-time PCR (RT-PCR) gibi PCR'a dayalı tiplendirme metodları da enterokok suşları arasındaki genetik ilişkinin araştırılmasında kullanılmaktadır. PCR ürünlerinin dizilenmesi veya restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) ile incelenmesi de enterokoklardaki spesifik direnç genleri arasındaki farklılıkları göstermede ve izlemede kullanılabilen yöntemlerdir (Baselski, 1996; Gibson ve ark., 1996; Cockerill, 1999; Kolbert ve Persing, 1999; Foy ve Parkes, 2001).

Sonuç olarak enterokoklar için eksiksiz, tek bir tiplendirme tekniği yoktur; özellikle genomik polimorfizme dayalı çeşitli tiplendirme tekniklerinin sonuçlarının birleştirilmesi yakın ilişkinin göstergesi olarak kullanılabilir.

### **2.8.1. Fenotipik tiplendirme metotları**

#### **2.8.1.1. Biyotiplendirme**

Biyotiplendirme mikroorganizmanın metabolik ve fizyolojik karakterlerini baz alır. Bu bağlamda enerji metabolizması, karbonhidrat kullanımı ve farklı enzimatik aktiviteleri ölçen test yöntemleri kullanılır. Elde edilen bulgular mikroorganizmanın genel morfolojik özellikleri ile birlikte sıklıkla otomatize edilmiş bir nümerik değerlendirme sistemi içerisinde sorgulanır. En çok kullanılan test sistemleri API 20 Strep, Api 50 CH ve Rapid ID 32 Strep'dir. Ayrıca eskulinaz ve piraz aktivitesi Apizym testi ile değerlendirilebilir. PhenePlatek PhP plate (PhPlate Microplate Techniques, Stockholm, Sweden) enterokokların epidemiyolojik özelliklerinin araştırmasında önemlidir ve PFGE ile elde edilen epidemiyolojik gruplar ile benzer gruplar vermektedir (Domig ve ark., 2003; Doğru ve ark., 2010b; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Bayram ve ark., 2011; Sırıken ve ark., 2011; Trivedi ve ark., 2011).

Bu test sistemlerinin tamamı, sınırlı sayıda enterokok türünü gösterir ve daha ileri seviyede identifikasyon gerektirir. Biyotiplendirmede yaklaşık olarak bakteriye ait 1600' den fazla özellik test sistemlerinde kullanılabilirse de aslında çoğu enzimatik özelliği tespiti yönelik 6 test ile suşların büyük birçoğunun tanımlanabileceği bildirilmiştir. Facklam and Collins, 1989'da enterokokların 20 temel fenotipik özelliğini baz alan bir identifikasyon sistemi tanımlamışlardır (Fackman ve Collins, 1989). Manero ve Blanch ise 1999 yılında, 19 enterokok türünün tanımlanması için 12 temel fizyolojik ve biyokimyasal özelliği dikkate alan bir biyokimyasal sistem geliştirmişlerdir. Reed ve ark. da enterokokların hızlı tür identifikasyonu ve vankomisin direncinin gösterilmesinde fenotiplendirme sistemine dayalı bir algoritma kullanmıştır. Bunun Api20 Strep sisteminden daha güvenilir olduğu sonucuna varmışlardır. Bejuk ve arkadaşları tarafından 2000 yılında bilgisayara dayalı inductive learning by logic minimisation (ILLM) sistemi geliştirilmiş ve bu yöntemle, klinik açıdan önemli olduğu bilinen 12

enterokok türünün tanımlanması mümkün olmuştur (Bejuk ve ark., 2000). Sonraki çalışmalarda Day ve ark. (2001) sadece dokuz özelliği sorgulayan test sistemi ile *E. faecalis* ve *E. faecium* 'u diğer enterokoklardan ayırılabilceğini göstermişlerdir (Day ve ark., 2001; Domig ve ark., 2003).

#### **2.8.1.2. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile protein fingerprinting**

Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri baz alan nümerik biyotiplenmenin zaman alıcı ve düşük ayırım gücüne sahip olması sebebi ile daha hızlı, güvenilir ve yüksek ayırım gücüne sahip tiplendirme yapabilen fenotipik özelliklere dayalı alternatif tiplendirme metodları içerisinde, hücre duvarı veya tüm hücre proteinlerinin mobil bir matriksde elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre göç ettirilerek ayrıştırılmalarını esas alan SDS-PAGE yöntemi, sık olarak kullanılmış, bu yöntemle çok sayıda suşun hızlı şekilde taranmasını sağlamış ve tür ve/veya alttür seviyesinde güvenilir sonuçlar elde edilmiştir.

Poliakrilamid jelde elde edilen protein profillerinin bakterinin eksprese ettiği proteinler için parmak izi olarak dikkate alındığı bu yöntem diğer sınıflandırma şemaları ile kombine edilerek, bilinmeyen izolatların tanımlanması amacı ile kullanılmaktadır. Son çalışmalarda elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların protein parmak izi ile DNA-DNA homoloji değerleri arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu göstermiştir. Andrighetto ve ark. (2001), İtalyan peynirlerinde enterokok türlerinin identifikasyonunda SDS-PAGE' i referans metod olarak kullanmış ve RAPD-PCR ile uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Devriese ve ark. (2002)'da filogenetik olarak yakın ilişkili *E. durans*, *E. hirae* ve *E. villorum* türlerinin ayrımının genomik metotların yanı sıra SDS-PAGE ile de yapılabilceğini göstermişlerdir. Klare ve ark. (1995) ise, 1993-1995 yılları arasında izole ettikleri glikopeptit dirençli *E. faecium* suşlarında 39 kDa luk bir sitoplazmik proteinin dirençle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca enterokoklarda penisilin bağlayan protein (PBP)'lerin SDS-PAGE kalıplarının DNA-DNA hibridizasyon sonuçları ile korele olduğu gösterilmiştir. Bu kalıpların, yeni türlerin tanınması ve tür ayırımında kesin bir metot olarak dikkate alınabileceği vurgulanmıştır (Domig ve ark., 2003).

### 2.8.1.3. Multi-lokus enzim elektroforezi (MLEE)

Multilokus enzim elektroforezis yöntemi, ökaryotik canlıların populasyon genetiği ve sınıflandırılmasında uzun bir süreden beri kullanılmakta olan standardize edilmiş bir metoddur. Son 20 yıldır da giderek artan yoğunlukda bakteriyel evrim ve sınıflandırmanın anlaşılabilmesi için kullanılmaya başlamıştır. MLEE'nin sınıflandırma ve epidemiyolojik ilişkiyi tespiti yönelik diğer fenotipik yöntemlerden farkı, allel profillerinin tamamını elektroforetik tip olarak verebilmesidir. Bu yöntem hücre içi enzimlerin elektroforetik hareket yeteneğine göre karakterize edilmesini esas alır ve organizmaları oluşturdıkları elektromorfo tiplerine göre diğerlerinden ayırır. Bu elektroforetik tiplerden popülasyon karakterizasyonu için objektif bir veritabanı oluşturulabilir. Genellikle, MLEE ile 20 kadar housekeeping enzimde doğal olarak yüksek değişkenlik gösteren lokuslar hedef alınır, bu sebeple teknik monolokus enzim elektroforezinden çok daha yüksek ayırma gücüne sahiptir (Tomayko ve Murray, 1995; Domig ve ark., 2003).

Enterokoklar bölünme, çoğalma, enerji transferi gibi hayati fonksiyonları düzenleyen çoğu yapısal işleve sahip 1600'den fazla enzim üretmektedir. Bu izoenzimler farklı katalitik özellik ve bu sebeple farklı elektroforetik hareket yeteneği gösterirler. Enzim çeşitliliği, primer izoenzim ve alloenzimler gibi direkt veya posttranslasyonel modifikasyonla oluşan sekonder izoenzimler gibi indirekt genetik faktörlere bağlıdır. İzoenzimler farklı hücre komponentlerinde dağılır ve en azından iki farklı gen ile kodlanırlar. Benzer substrat spesifitesi olan enzimleri kodlayan multiple lokuslar gen duplikasyonları oluşumunu sağlar. Nokta mutasyonlarının sonucu olarak, duplike genlerin kodladığı aminoasitlerin kompozisyonu değişir ve elektroforezde farklı hareket yeteneğine sahip enzimler tespit edilir. Elektroforetik hareketteki farklılıklar şarj ve/veya büyüklük farklılığı ile oluşur. Bu enzimler iki yönlü izoelektrofokusun yöntemi ile enterokoklara ait olası enzimlerin en az %50' si araştırılmıştır (Feizabadi ve ark., 2003).

#### **2.8.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri**

Bu tiplendirme standart bir dizi antibiyotiğe karşı farklı izolatların duyarlılık kalıplarının karşılaştırılması esasına dayanır. Farklı duyarlılık kalıbı veren izolatlar epidemiyolojik köken olarak farklı suşlar olarak kabul edilirler. Farklı hastaların klinik örneklerinden izole edilen suşlar arasında yeni veya alışılmışın dışında bir antibiyotik duyarlılık kalıbı ile karşılaştırılması halinde o suş yeni bir salgının habercisi olarak değerlendirilir. Bu yöntemle düşük sensitivitede de olsa bütün izolatlar tiplendirilebilir. Yöntem rutin uygulanan bir işleme dayandığı için fazla tecrübeyi gerektirmeyen kolay bir tekniktir. Bu sebeple enterokokların sebep olduğu enfeksiyonların epidemiyolojisinde başarılı bir ayırt edici test sistemi olarak kullanılmıştır. Enterokoklarda, bazı antibiyotiklere karşı görülen intrinsik direncin yanı sıra, konjugatif plazmidlerde veya transpozonlarda kodlanan çok sayıdaki mekanizma ile çok sayıdaki antibiyotiğe karşı direnç görülür. Benzer direnç genlerine sahip enterokok türleri hayvan atıkları, gıda örnekleri ve çevresel örneklerde de görülebildiği için antibiyotik direnç kalıpları, enterokok izolatlarının kaynak tespitinde yani epidemiyolojik izlemde sınırlı öneme sahiptir. Hastane kökenli enterokoklarda, 1980’li yılların sonlarına kadar yüksek düzeyli gentamisin direncinin yanı sıra ampicilin direnci görülürken, son 20 yılda bu gruba %30’lara ulaşan vankomisin veya glikopeptid direncide eklenmiştir. Enterokok suşlarının antibiyotik kalıplarının çıkartılması bir taraftan düşük ayırım gücüne sahip epidemiyolojik sonuçlar yaratırken, direncin engellenmesi, yeni antibiyotiklere karşı direnç trendinin takibi ve özellikle tedavileri problemlili olan VanC’ye sahip enterokokların izlenmesi açısından önemlidir. Bu tekniğin en belirgin dezavantajı; aynı antibiyotiğe farklı genetik mekanizmalarla direnç geliştiren izolatları birbirinden ayırt edememesidir. Bu epidemiyolojik izlemde ayırım gücünü düşürür. Belirli bir zaman dilimi içerisinde aynı suşun farklı izolatları bir veya birden fazla farklı antibiyotiğe karşı farklı direnç kalıbı verebilirler (Hsieh, 2000; Domig ve ark., 2003; Doğru ve ark., 2010b; Frye ve Jackson, 2013).

#### **2.8.1.5. Serotipleme**

Enterokoklar opsonizan antikorların hedefi olan kapsüler polisakkarid antijenlere sahiptir. Lancefield R. (1933) streptokokları C polisakkarit antijenlerine göre yaptığı

sınıflandırmada, enterokoklarda ortak kapsüler polisakkaridi tanımlayarak, bu grup antijenini D grubu olarak tanımlamıştır. Enterokoklarda kapsüler polisakkarid antijen, 6-alfa-D-glucose-1-2-glycerol-3-PO<sub>4</sub>'ın tekrarlayan ünitelerinden oluşan, gliserolteikoik asit benzeri bir yapı gösterir. Bu yapıda glikoz molekülüne bağlı alfa1,2 ile karbon 2 atomları yer değiştirmiştir. HCl veya formalin ile elde edilmiş kapsül polisakkaritlerine karşı tavşanlardan elde edilen opsonizan antiserumlar kullanılarak yapılan subtip çalışmalarda iki farklı şemada 24 ve 21 serotip tespit edilmiştir. Ancak Sharpe tarafından yapılan antijenik sınıflandırmada bildirilen serotiplerden sadece 9'unun gerçek enterokok olduğu belirlenmiş ve 21 serotipli şemanın daha gerçekçi olduğu, bu şema ile izolatların %76'nın üzerinde bir oranda tiplendirilebildiği vurgulanmıştır (Fabretti ve Huebner, 2005; Hufnagel ve ark., 2006).

Enterokokların fenotipik identifikasyonu ve tiplendirilmesinde bu yöntemlerin dışında bir çok araştırmacı tarafından bakterinin, uzun zincirli yağ asitleri, hücre membranı yağ asitlerinin metil ester analizi, enterosin analizi, hücre membranının pyrolizin ekstraksiyonunun mass spektro ile analizi, fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve proton manyetik rezonans spektroskopisi (MRS) gibi çeşitli yöntemler denenmiş, sınırlı kullanım alanı bulan bu yöntemlerden bazılarının PFGE'ine yakın ayırım gücü gösterdiği bildirilmiştir (Domig ve ark., 2003).

### **2.8.2. Genotipik tiplendirme metotları**

Enterokok izolatlarının hızlı identifikasyonu ve tiplendirilmesinde, son araştırmalar moleküler biyoloji tekniklere odaklanmıştır. Enterokoklara bağlı salgın epidemiyolojisinde kullanılan moleküler tiplendirme metotları Willey ve ark. tarafından 1994 yılında toparlanmıştır. Kromozomal DNA'nın G+C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon denemeleri gibi bakteri sınıflamasındaki ana teknikler sıklıkla yeni izole edilerek tanımlanan suşların karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Genomda spesifik bölgelerin invitro şartlarda amplifikasyonu, amplifiye ürünlerdeki spesifik mutasyonların restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşturdukları bantların polimorfizmi ve sonuçta toplam genomun spesifik şartlarda bir restriksiyon enzimi ile hazırlanmasında oluşan bant kalıplarının polimorfizminin analizi enterokokların sebep

oldukları salgınların analizinde salgın suşlarının klonal düzeyde tanımlanması için kullanılmıştır (Kariyama ve ark., 2000; Sedgeley ve ark., 2005).

#### **2.8.2.1. Restriksiyon enzim analizi (REA) bazlı yöntemler**

Enterokokların kromozomal restriksiyon analizinde, mikroorganizmalardan izole edilen DNA uygun restriksiyon enzimlerinden bir veya bir kaç ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA fragmanları agaroz jel elektroforezi ile bant büyüklüklerine göre ayrıştırılmaktadır. Elde edilen bant paternlerinin polimorfizmine göre tiplendirme yapılmaktadır (Patel ve ark., 1997; Kariyama ve ark., 2000; Sedgeley ve ark., 2005). Savor ve ark. (1998) klinik örneklerden izole edilen *E. faecium*'ları REA ve PFGE yöntemleri ile incelemiş ancak her iki yönteminde ideal olmadığını bildirmişlerdir.

##### **2.8.2.1.1. Plazmid DNA profil analizi**

Plazmid DNA'sı ekstrakte edildikten sonra ya REA ya da PFGE gibi spesifik bir enzimle hidrolize edildikten sonra agaroz jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmaktadır. Bant polimorfizmi tiplendirme amacı ile kullanılmaktadır. Ancak yöntemin önemli dezavantajları bulunmaktadır. Mesela plazmidler fermentasyon ve diğer teknolojik işlemler sırasında kaybolabilmektedir veya konjugatif transfer ile yeniden düzenlemeye uğrayabilmektedir.

Donabedian ve ark. (1992) *E. faecium* suşlarının tiplendirilmesinde plazmid analizini plazmid restriksiyon analizi ve PFGE ile beraber kullanmıştır. Plazmid profil analizi ve PFGE kombinasyonu ile ev yapımı Pecorino Sardo peynirlerinden izole edilen yakın ilişkili suşların tanımlanması mümkün olmuştur (Mannu ve ark., 1999).

*E. faecium* suşlarının tiplendirmesinde direnç paternleri ve plazmid profil analizinin RAPD-PCR'a komplementer teknik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Son ve ark., 1999).

##### **2.8.2.1.2. Pulsed field gel elektroforezi (PFGE)**

Pulsed field gel elektroforez yöntemi ile REA'de olduğu gibi genomdaki bilinen spesifik bir bölgenin amplifikasyonu sonucu elde edilen nispeten kısa ampikonların

değil, total genomun bir restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan bant polimorfizmi değerlendirilmektedir. Büyük genomdan elde edilecek bantlarında bir kısmının oldukça büyük olacağı varsayımından hareketle bu yöntemde PCR-RFLP'den farklı elektroforez şartları kullanılmaktadır. Tek yönlü düzenli elektrik akımı altında DNA fragmentlerinin moleküler büyüklüklerine göre yürütülerek ayrıştırıldığı geleneksel jel elektroforezde 50 kb'dan büyük DNA molekülleri aynı mobilitayı göstermektedir. Bu sebeple 50 kb'dan büyük DNA fragmentleri jel içinde geniş, ayrışmamış bantlar olarak görülürler ve standart jel elektroforezi ile ayırt edilmeleri imkansızdır. PFGE yönteminde, elektrik akım yönünün periyodik olarak değiştirilmesi ve jeldeki DNA fragmentleri üzerine belirlenen aralıklarla düz akım gönderilebilmesi sonucu, 50 kb'dan daha büyük DNA molekülleri bile kolaylıkla ayrıştırılabilmekte ve genomun tamamını değerlendirmek mümkün olmaktadır. PFGE yönteminde bakteriyel enzimlerin spontan degradasyonundan korumak amacı ile agaroz jel içine gömülü haldeki bakteriden, bütünlüğü bozulmadan izole edilen DNA, yine jel içerisinde iken bilinen 5-6 baz uzunluğunda tanıma bölgesine sahip bir restriksiyon enzimi yardımıyla hidrolize uğratarak kesilmektedir. Agaroz jel içerisinde elde edilen DNA fragmentleri akım yönü ve şiddeti belirli aralıklarla değiştirilerek elektroforeze tabii tutulmaktadır. Elektroforez sonrası jelin ethidium bromid ile boyaması sonucu jeldeki DNA fragmentleri UV ışıktaki görüntülenmekte ve elde edilen bant polimorfizmi gözle veya bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilmektedir. PFGE ile elde edilen bant paternlerine göre hem kromozomal DNA'nın büyüklüğü tahmin edilebilmekte, hem de suşların klonal olarak ilişkilendirilmeleri mümkün olmaktadır. PFGE oldukça yüksek ayırım gücü olan, sonuçları tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir bir yöntem olduğu için genotipik identifikasyonda, özellikle hastane enfeksiyonlarının surveiansında referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntemin en önemli dezavantajları pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması, zaman alıcı oluşu ve hala pek çok tür için standart protokollerin oluşturulamamış olmasıdır (D'Agatai ve ark., 2001; Vancanneyt ve ark., 2002; Domig ve ark., 2003; Singh ve ark., 2006; Van Belkum ve ark., 2007).

Pulsed field jel elektroforez yöntemi hastane kökenli enfeksiyonlardan ve çevresel örneklerden izole edilen VRE/GRE'lerin klonal ilişkilerinin tespitinde de başarı ile kullanılmıştır (Goering, 2000; Mulvey ve ark., 2001; Struelens ve ark., 2001).

### 2.8.2.1.3. Ribotipleme

Son yıllarda epidemiyolojik sürveyans amacı ile mikroorganizmalarda 16S *rRNA*, 23S *rRNA* ve 5S *rRNA* genleri arasında bulunan spacer bölgelerdeki heterojeniteyi hedef alan nükleik asit amplifikasyonuna dayalı teknikler denenmiştir. PCR-ribotipleme yöntemi ile *rRNA* operonunda cins ve tür düzeyinde farklı büyüklüğe sahip çok sayıdaki spacer bölgeleri hedef alınır. Bu yüzden belirli bir suşta farklı büyüklükte spacer bölgeleri bulunduğundan çok sayıda bant elde edilir. Bu teknik birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteri tiplerinde kullanılmaktadır *E. faecium* suşlarının PCR-ribotipleme ile analizinin, bu bakteri türünde en az dört sınıf intergenik spacer bulunduğu için, yararlı olmadığı sonucuna varılmıştır (Van den Braak ve ark., 1998; Carretto ve ark., 2000; Achtman ve ark., 2001; Wang ve ark., 2001; Domig ve ark., 2003).

Ayrıca restriksiyon enzimleri kullanılarak da ribotipleme yapılabilir. Bu yöntemde bakteri kromozomu ekstrakte edilir ve restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezi ile ayrılır. Naylon veya nitroselülöz membrana blotlanan DNA fragmentleri 23S *rRNA*, 16S *rRNA* ve 5S *rRNA* dizisinin hedef dizilerini tanıyan problarla hibridize edilir. Brisse ve ark. (2002), ribotipleme yöntemini hastane kökenli VRE'lerin klonal ilişkilerini göstermek amacı ile kullanılmış, yöntemin duyarlılığının PFGE ile kıyaslandığında yeterli olduğu, yüksek performans laboratuvarlarında değerli bir primer tipleme tekniği olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu tekniğin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu ve epidemiyolojik olarak önemli genotipleri tanımlayabildiği de gösterilmiştir (Hammerum ve ark., 2000; Brisse ve ark., 2002). Buna karşın Price ve ark. (2002) bu yöntemin VRE çalışmaları için güvenilir olmadığını ileri sürmüştür (Price ve ark., 2002).

### 2.8.2.2. Nükleik asit amplifikasyonu bazlı (NAAB) teknikler

Mutasyonların belirlenmesi için, mikroorganizmaların spesifik gen bölgeleri ile direnç genleri gibi bilinen gen bölgelerinin amplifikasyonuna dayalı tekniklerdir. Nükleik asit amplifikasyonunun klinik mikrobiyolojide kullanımı Prob-temelli saptama, büyüklük-temelli ayırım, immün-temelli saptama, elektrokimyasal saptama, dizi-temelli saptama ve sekanslama üzerine temellendirilmiştir. Bu yöntemler homojen ve heterojen

özellik gösterir (Bej ve ark., 1990; Baselski, 1996; Gibson ve ark., 1996; Cockerill, 1999; Kolbert ve Persing, 1999; Pitt ve Saunders, 2000; Foy ve Parkers, 2001).

#### **2.8.2.2.1. Polymerase chain reaction (PCR) bazlı teknikler**

Bütün mikroorganizmalarda olduğu gibi enterokokların tür, suş ve genotip tayininde başarı ile kullanım alanı bulmuştur. Bu amaçla enterokoklardaki “elongasyon faktör *tuf* genini (EF-Tu) hedef alan primerler, cins (Ke ve ark., 1999) düzeyinde, D-alanin/D-ligaz geni (*ddl*) ve *groESL* genini hedef alan primerler de tür düzeyinde tanı amacı ile kullanılmıştır (Domig ve ark., 2003). Kniff ve ark. tarafından (2001) *ddl* genini hedef alan tür spesifik primerler *E. durans* ve *E. hirae* için onaylanmıştır (Knijff ve ark., 2001). PCR bazlı metodlar antibiyotik direncinin tespiti için de uygulanmış, böylece bir taraftan hızlı duyarlılık testi yapılırken diğer taraftan izole edilen suşlar arasında vertikal yayılan direnç genleri veya gen mutasyonları sebebi ile klonal ilişkide gösterilebilmiştir. Dutka-Malen ve ark. (1995) *ddl* genini hedef alan primerler ile hem tür düzeyinde tanı hem de glikopeptid direncinin tespitini yapabildiklerini bildirmişlerdir (Dutka-Malen ve ark., 1995). Miele ve ark. (1995)’da *van* genleri için bir primer seti geliştirmiş, aynı yıl Klare ve ark. (1995) *vanA* genine yönelik PCR yöntemini kullanmıştır. *vanA* ve *vanB* genini hedef alan yeni primerler de geliştirilmiş ve aynı primerler, Del Vecchio ve ark. (1998) tarafından flöresana dayalı PCR sistemi LightCycler’da kullanılmıştır (Domig ve ark., 2003). Daha sonra enterokokların tanısında ve epidemiyolojik sürveyansında kullanılmak üzere, çok sayıdaki araştırmacı tarafından, enterokokların *16S rRNA*’sını hedef alan primerlerle tür tayini ile eş zamanlı olarak *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *C2* ve *C3* genlerini alan primerlerin kullanıldığı, glikopeptid direncinin tespitine yönelik multipleks PCR protokolleri geliştirilmiştir (Dutka-Malen ve ark., 1995; Kariyama ve ark., 2000; Perez-Hernandez ve ark., 2002; Garcia-Migura ve ark., 2005; Çöleri ve Çökmüş, 2008). Enterokokların virulans genlerini (*esp*, *cyl*, *gelE* ve *hyl* gibi) hedef alan PCR teknikleri geliştirilmiştir (Biovasco ve ark., 2007; Doğru ve ark., 2010a; Radhouani ve ark., 2013).

#### **2.8.2.2.1.1. Multipleks PCR**

Multipleks PCR aynı tüpe farklı hedefler için özgül olan iki veya daha fazla primerin birlikte konulduğu ve aynı anda çok sayıda hedef dizinin amplifiye edildiği bir amplifikasyon reaksiyonudur (Chamberlain ve ark., 1988; Tang ve Persing, 1999). Multipleks reaksiyonda kullanılan primerlerin benzer bağlanma ısılarına sahip olmaları ve dimerizasyondan kaçınmak için birbirlerini tamamlayıcı özellikte olmamalarına mutlaka dikkat edilmelidir. Sıklıkla çok sayıda ampirik deneme gerekir. Çok sayıda hedefin birlikte amplifikasyonu farklı amaçlar için kullanılabilir. Tanısal amaçlar için multipleks PCR, internal kontrolleri tayin veya tek bir örnekteki çok sayıda patojenin tespit edilmesi amacıyla uygulanabilmektedir (Bej ve ark., 1990; Geha ve ark., 1994; Roberts ve Storch, 1997). Multipleks PCR'ın bir çeşidi olan kantitatif kompetitif PCR, örnek içerisinde hedef dizilerin miktarlarını ölçmek için kullanılabilir (Piatak ve ark., 1993; Yang ve ark., 1994). Multipleks PCR denemeleri, hedef nükleik asitlerin sınırlı olmadığı insan ve kanser genetiğinde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte enfeksiyöz organizmaların saptanması için geliştirilen multipleks PCR denemeleri çok daha karmaşıktır ve daha düşük duyarlılıkla sonuçlanabilmektedir.

#### **2.8.2.2.2. Random amplified polymorphic (RAPD) DNA-PCR ve arbitrarily primed (AP) PCR**

Random primerler kullanılarak DNA polimorfizminin gösterilmesine dayalı metottur. Düşük annealing ısısında, yüksek Mg<sup>+</sup> konsantrasyonunda random düzenlenmiş kısa primerlerin bakteri DNA'sına rastgele bağlanması ile oluşan primer-DNA hibridlerinin amplifikasyonu sonucu oluşan DNA fragmentlerinin polimorfizmini hedef alan PCR bazlı bir yöntemdir. RAPD metodu, iki yerine tek primer kullanımı ve bağlanma ısısının düşük olması açısından klasik PCR'dan farklıdır. RAPD-PCR'ın klinik örnekler ve gıda örneklerinden izole edilen enterokokların tanımlanması ve ayrılmasında güvenilir bir teknik olduğu ileri sürülmüştür (Domig ve ark., 2003). Hastane kökenli VRE'ların epidemiyolojik surveyansında hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu ancak yüksek düzeyde aminoglikozid direnci (HLAR) gösteren enterokokların tiplemesinde tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu bildirilmiştir (Chiew ve Hall, 1998). Bazı çalışmalarda RAPD ve PFGE yöntemlerinin sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu

gösterilmiştir (Van den Braak ve ark., 1998). Devriese ve ark. (2002) AP-PCR kullanarak *E. durans*, *E. hiraе* ve *E. villorum*'un bütün suşlarını bant paternlerindeki farklılıklara göre gruplamıştır.

#### **2.8.2.2.3. Spesifik ve random amplifikasyon (SARA) PCR**

Tek bir reaksiyonda Enterokok türlerinin tanımlanması ve *vanA* geninin gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. Teknik *vanA* primer seti kullanımına dayalıdır. *vanA* geni bulunan suşlarda yaklaşık 700bp' lik bant ile birlikte kompleks paternle oluşmaktadır (Domig ve ark., 2003).

#### **2.8.2.2.4. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)**

Bu yöntem total genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile açık uçlu olarak kesilmesi sonrasında açığa çıkan DNA fragmentlerinin, ligaz enzimleri yardımı ile açık uçla uyumlu oligonükleotit adaptörleri ile ligasyonunu ve ligasyonla yerleştirilen oligoları hedef alan primerler kullanılarak amplifikasyonlarını hedef alan bir yöntemdir. Klasik PCR yöntemlerinde olduğu gibi amplikonların polimorfizmi, agaroz jelde veya kapiller elektroforezle tanımlanmaktadır. Jureen ve ark. (2003) çalışmasında enterokokları AFLP ve PFGE ile incelemiş ve bu iki tekniğin iyi bir uyum gösterdiğini bildirmişlerdir (Jureen ve ark., 2003). Ancak bazı çalışmalarda VRE' ler için AFLP yöntemi PFGE ye kıyasla uyumsuz sonuçlar vermiştir (D'Agatai ve ark., 2001).

#### **2.8.2.2.5. Repetitive polimeraz zincir reaksiyonu (REP-PCR)**

Repetitive-PCR metodu bakteriyel genomda dağılmış olarak bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin kopyalarının PCR ile gösterimine dayalıdır. Bu tekrarlayan DNA elementleri cins ve türlere göre değişmek üzere genomda farklı uzaklıklar da yerleşmiştir. Bu tekrarlayan elementleri hedef alan primerlerin kullanıldığı amplifikasyon sonucunda değişik uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentlerin polimorfizmi spesifik DNA fingerprinting (parmak izi) olara değerlendirilir. Yapılan kıyaslamalı çalışmalarda Rep-PCR ile oluşan polimorfik DNA kalıplarının yorumunun PFGE'i ile elde edilen kalıplara göre daha zor olduğu ve

aralarında uyumsuzluk olduğu ileri sürülmüştür (Bedendo ve Pignatari, 2000; Domig ve ark., 2003).

#### **2.8.2.2.6. İntergenik rRNA spacer bölgeleri PCR (ITS-PCR)**

Enterokok türleri için spesifik olan, 16S rRNA ve 23S rRNA arasında yer alan intergenik spacer bölgesini hedef alan primerlerin kullanıldığı bir amplifikasyon yöntemidir (Domig ve ark., 2003). Amplikonlar yüksek rezolüsyonlu %6 non-denatüre akrilamid bisakrilamid jel elektroforezi ile incelenmiştir. Bu metotla incelenen *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. faecalis* ve *E. hirae* benzer profil göstermiştir. Daha ayırt edici sonuçlar elde edebilmek için ampikon Sau3A1 restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve ortaya çıkan fragment polimorfizmi ile *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans* ve *E. hirae* birbirinden ayırt edilebilirken *E. gallinarum* için spesifik polimorfizm tespit edilememiştir (Park ve ark., 1999).

#### **2.8.2.2.7. Diğer amplifikasyon bazlı yöntemler**

Çeşitli klinik ve çevresel örneklerden izole edilen enterokokların cins ve tür düzeyinde tanımlanması amacı ile bakteri genomundaki spesifik bölgeleri hedef alan çeşitli amplifikasyon bazlı modifikasyonlar kullanılmıştır. Bunlar arasında; 16S rRNA genini çevreleyen fragmanları hedef alan, “Amplified rDNA Restriction Analysis - ARDRA” yöntemi, PCR-Ribotipleme, SDS-PAGE ve 16S rRNA dizi analizini kombinasyonu olan “PCR-amplified 16S rRNA-RFLP” yöntemi, *groESL* geninin spesifik primerlerle amplifikasyonu sonucu oluşan ampikonun HaeIII ve RsaI ile kesilmesi sonucu oluşan bant polimorfizmini hedef alan “Broad range PCR-RFLP” yöntemi, özellikle klinik olarak önemli enterokok türlerinin tanımlanmasında yararlı olduğu ileri sürülen, DNA dizisinde tek nükleotit farklılığını Tm ısı farklılığı ile ortaya koyan “temporal temperature gradient gel elektroforezi - TGGE” yöntemi, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının ayrımında başarı ile uygulanan “denaturing gradient gel elektroforezi – DGGE” yöntemi, insan ve hayvan orijinli enterokokal türlerin ayrımında denenmiş olan “tRNA-intergenik length polimorfizm analizi - tDNA-PCR” yöntemi, özellikle 16S rRNA ve 23S rRNA genleri olmak üzere ITS bölgeleri, *Chaperonin 60* (Cpn60) geni, *groES* ve *groEL* genlerini,

*vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanD* genini ve sonuçta *HLGR* genlerini hedef alan problemlerin kullanıldığı “nükleik asit hibridizasyon” yöntemi, *vanA* ve *vanB* genlerini hedefleyen primerlerin kullanıldığı, spesifik mRNA’yı gösteren reverse transkriptaz - PCR (RT-PCR) yöntemi kullanım alanı bulan önemli yöntemlerdir (Myers ve Gelfand, 1991; Young ve ark., 1993; Domig ve ark., 2003).

### **2.8.2.3. Dizi analizi yöntemleri**

Diğer birçok mikroorganizmada özellikle tek nokta mutasyonlarına dayalı bilinen veya bilinmeyen farklılıkları tespiti için kullanılan ve epidemiyolojik metodlar içerisinde en yüksek ayırım gücüne sahip olan dizi analizi yöntemi enterokok izolatlarının cins ve tür ayırımının yanı sıra izolatların klonal ilişkilerinin tespitinde de kullanılmıştır.

#### **2.8.2.3.1. Parsiyel dizi analizi**

*16S rRNA* V4 ve V9 bölgelerine yönelik PCR analizini takiben yapılan parsiyel dizi analizi, enterokokların identifikasyonu ve sınıflamasında güvenilir bir tekniktir. VRE’lerin identifikasyonunda da multipleks PCR ile kombine olarak bu yöntem kullanılmıştır. Bu gen bölgesi dışında izolatların identifikasyonu için; *ddl* geni, *cpn60* geni, *groES* geni, *sodA* genlerinde dizi analizi yapılması önerilmiş, Poyart ve ark. (2000) tarafından özellikle *sodA* geninin dizi analizinin *16S rRNA* geni dizi analizine göre daha diskriminatif olduğu ileri sürülmüştür.

#### **2.8.2.3.2. Multilokus sequence tipleme (MLST)**

Pekçok bakteriyel türün virulans faktörlerinin ve moleküler epidemiyolojik özelliklerin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Housekeeping genlerin internal parçalarının DNA dizisindeki allelleri tanımlama temeline dayalı bir yöntemdir. Enterokoklarda MLST’nin, özellikle *E. faecium* suşlarının, uluslararası veri bankasını oluşturmada uygun bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır (Homan ve ark., 2002).

Sonuç olarak, enterokokları tanımlama, karakterize etmede ve tiplendirmede taksonomik ayırım yetenekleri değişen çok sayıda teknik kullanılmaktadır. Son 15 yılda

metodolojik gelişmelerden dolayı bakteriyel taksonomi yeniden gözden geçirilmektedir. Özellikle enterokoklarda modern bakteriyel taksonomi çeşitli çalışmalarla elde edilen geniş çaplı bilgilerle tamamlanmaktadır. Rutin incelemelerde klasik fenotipik yöntemler önemini hala koruyor olmasına rağmen, genotipik yöntemler mikroorganizmaların tam olarak karakterizasyonu ve klonal düzeyde ayırt edilmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca bu teknikler yalnızca insan sağlığı alanında değil, bunun yanında hayvansal gıda zincirinde (kanatlılar vb.) ve yabani hayatta epidemiyolojik araştırmalarda da güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Polifazik bir yaklaşımla, fenotipik ve genotipik modern yöntemlerin kombinasyonu güvenli identifikasyon için uygun bir çözümdür.

## 2.9. Enterokok Enfeksiyonlarının Tedavisi

Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi, ilk seçenek antibiyotiklere karşı değişen düzeyde direnç göstermeleri sebebi ile oldukça zor ve karmaşıktır. Enterokokların neden olduğu üriner enfeksiyonlar, peritonit ve yara enfeksiyonlarının çoğu ampisilin, penisilin veya vankomisin gibi tek ilaçla tedavi edilebilirken; endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi enfeksiyonlar da hücre duvarına etkili bir ajanla bir aminoglikozitin birlikte uygulanması sinerjistik etki göstermektedir. Penisilin alerjisi olan hastalarda veya penisilin/ampisilin dirençli suşlarla olan enfeksiyonlarda vankomisin ve aminoglikozid kombinasyonu da sinejistik etkilidir. Ancak, yüksek düzeyde aminoglikozit ve ampisilin direncine ek olarak vankomisin direncinin de hızla yayılması, başta *E. faecium* enfeksiyonları olmak üzere VRE ile olan enfeksiyonların tedavisini, son derece problemli hale getirmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000; Boogard ve ark., 2002; Hayes ve ark., 2003; Alp ve Şardan, 2008; Oravcova ve ark., 2013).

*E. faecalis* izolatlarının hemen tamamı ampisiline orta düzeyde duyarlıdır. Bu yüzden bu izolatlarda vankomisin direnci olsa dahi, tedavileri nispeten kolaydır. Ancak penisilin ve ampisiline doğal olarak daha dirençli olan *E. faecium*'larda da vankomisin direnci görülmektedir (Çetinkaya ve ark., 2000; Zırakzadeh ve Patel, 2006; Santos ve ark., 2013).

Eğer VRE ampisiline yüksek düzeyde dirençli ise, tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol, yüksek düzey aminoglikozit, rifampin, florokinolon, novobiosin ve

üriner enfeksiyonlar için nitrofurantoin gibi antibiyotiklere duyarlılık araştırılmalıdır (Murray, 1997; Çetinkaya ve ark., 2000; Alp ve Şardan, 2008).

Farklı mekanizmalar ile direnç geliştiğinden, yüksek düzeyde gentamisin dirençli enterokoklarda streptomisin direnci araştırılmalıdır. Her iki aminoglikozide de direnç varsa, hiçbir tedavi rejiminin güvenilir bir bakterisidal etki oluşturması beklenmemelidir. Çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklarda tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır ve optimal tedavi tam olarak bilinmemektedir (Çetinkaya ve ark., 2000; Joseph, 2000; Alp ve Şardan, 2008; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Kloramfenikol: Çoklu ilaç direnci gösteren *E. faecium*'lara invitro etkili olabilir ancak VRE enfeksiyonları tedavisinde sınırlı başarı gösterir, mortalitede azalmaya yol açmaz (Çetinkaya ve ark., 2000; Frye ve Jackson, 2013).

Seftriakson: Glikopeptit direncini indüklediğinden normalde enterokoklara etkisizdir. Seftriakson, vankomisin ve gentamisin kombinasyonu, glikopeptit dirençli *E. faecium*'larda etkin olarak bildirilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000; Frye ve Jackson, 2013).

Rifampin: Enterokokal enfeksiyon tedavisinde, zayıf bakterisidal etkisi ve direnç gelişiminden dolayı kullanımı kısıtlıdır (Moellering ve Wennersten, 1983; Frye ve Jackson, 2013).

Fosfomisin: Enterokoklara karşı etkinlik gösterir. Fakat tek başına kullanıldığında hızla direnç gelişir (Çetinkaya ve ark., 2000; Frye ve Jackson, 2013).

Tetrasiklin: VRE'lerin bazılarına etkilidir. Doksisiklin ve minosiklin diğer ajanlar ile beraber kullanılabilir. Ancak tetrasiklin direnci oldukça yüksek oranda görülmektedir. Glisilsiklin olarak bilinen tetrasiklin deriveleri çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklara mükemmel etkinlik göstermektedir. Bakteriyostatik etkilidir (Testa ve ark., 1993; Frye ve Jackson, 2013).

Siprofloksasin ve diğer kinolonlar: Enterokoklara orta derecede etkili ajanlardır ve kullanımları üriner enfeksiyonlar ile sınırlıdır. Gentamisin, ampisilin veya rifampin ile kombine kullanılırsa VR *E. faecium*'lara etkilidir. Yeni florokinolonlar ise Gram

pozitiflere daha yüksek aktivite gösterirken enterokoklara karşı daha az etkindir. Klinafloksazin enterokoklara en etkin ajandır. Ampisilin ile kombine kullanılırsa bakterisidal etki gösterir (Burney ve ark., 1994; Piddock, 1994; Çetinkaya ve ark., 2000; Frye ve Jackson, 2013).

Nitrofurantoin: Pek çok VRE'ye karşı etkilidir ve üriner enfeksiyonlarda bir seçenek olabilir. Çoklu ilaç direnci gösteren enterokok tedavisinde etkin bir antimikrobiyal tedavi belirlenmemiştir (Zırakzadeh ve Patel, 2006; Frye ve ark., 2013).

Teikoplanin: VanB tipi enterokoklara etkin diğer bir glikopeptittir. Aminoglikozitlerle kombine edildiğinde endokarditlerde etkin olabilir. Ancak VanB tipi *E. faecium*'larda invivo teikoplanin direnci geliştiği de bildirilmiştir. VRE enfeksiyonlarında yeni yaklaşımlar olarak  $\beta$ -laktam –  $\beta$ -laktam,  $\beta$ -laktam-glikopeptit,  $\beta$ -laktam - florokinolon kombinasyonları hayvanlarda incelenmiştir. Ampisilin ve vankomisine dirençli olmasına rağmen  $\beta$ -laktam - glikopeptit kombinasyonunun kullanımı ile *E. faecium* inhibe olabilir. Bazı suşlarda vankomisin varlığında ampisilin MİK değeri azalmaktadır (Hayden ve ark., 1993; Frye ve ark., 2013).

Son yıllarda VRE/GRE enfeksiyonlarının tedavisinde yeni seçenek antibiyotikler denenmeye başlanmış olup bunlardan bir kısmı eski ürün olup yeni endikasyon alanı bulmuşken bazıları hala Faz III düzeyinde, bazıları da FazIV'de klinik deneme aşamasındadır. Bunlardan en önemlileri;

Kuinupristin/dalfopristin: Streptogramin grubu antibiyotiktir ve VR *E. faecium* suşlarına karşı bakteriyostatik aktivite gösterir. Ancak *E. faecalis* suşlarına interensek direnç sebebi ile etkin değildir (Zırakzadeh ve Patel, 2006). Hayatı tehdit eden VR *E. faecium* bakteriyemilerinin tedavisinde onaylanmıştır. Protez kapak endokarditi, ventrikülit, katater ilişkili peritonitlerde etkin bulunmuştur (Zırakzadeh ve Patel, 2006; Frye ve Jackson, 2013).

Daptomisin: Asidik bir lipopeptittir ve ümit verici klinik sonuçlar alınmaktadır. Enterokokların bütün türlerinde MİK değeri düşüktür, inokülüm etkisi zayıftır ve tek başına bakterisidal etkilidir. Glikopeptitler ile çapraz direnç görülmez (Sabol ve ark., 2005).

Oritavansin: Semisentetik bir glikopeptittir, VRE'ye karşı en etkin ajanlardan birisidir ve bakterisidal etkinlik gösterir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak vankomisine benzer olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır (Schwalbe ve ark., 1996).

Oksazolidinonlar: Yeni sentetik antibiyotiklerdir. Protein sentezini inhibe ederler. Enterokoklara karşı etkinlikleri iyidir. Bu gruptan linezolid FDA tarafından onaylanmıştır (Bostic ve ark., 1998; Zırakzadeh ve Patel, 2006; Frye ve Jackson, 2013).

## **2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri**

VRE'nin dünya genelinde eradikasyonu için insan, hayvan ve çevre bazlı koruma ve kontrol önlemlerinin alınması bir zorunluluktur. Buradan yola çıkarak hem insan hem de hayvan sağlığı açısından dikkat edilmesi gereken noktalar olduğu bilim insanları tarafından farklı tarihlerde ortaya konulmuştur (Başustaoğlu, 2004; Manley ve ark., 2007).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1997 yılında “The Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals” adı altında Berlin’de bir toplantı düzenlemiş ve VRE ile mücadele noktasında uluslararası bir fikir ve uygulama birlikteliği sağlamak için ilk adımı atmıştır. Daha sonra 2000 yılında Cenevre’de düzenlediği toplantı sonrasında “The World Health Organization Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food” dokümanında bu konuda uygulanmasını önerdikleri kuralları yayınlamıştır. Bu önerileri özetleyecek olursak;

1. Hükümetler ve uygulayıcı otoriteler hayvanlarda antimikrobiyal ajanların kontrollü kullanımı, pazarlama ve bunun sonucunda ortaya çıkabilecek direncin önlenmesi için ulusal stratejiler geliştirmelidir.

2. Antimikrobiyal ajanın hayvanlarda kullanımı için onay verilmeden önce etken madde bilimsel, epidemiyolojik veriler doğrultusunda değerlendirilmeli, direnç gelişimi açısından detaylı incelenmeli ve bu sonuçlara göre onay verilmelidir.

3. Kullanımına onay verilen antibiyotikler için ulusal düzeyde kullanım, kontrol ve takip sistemi oluşturulmalı, ulusal düzeyde direnç takip sistemi oluşturulmalıdır. Özellikle veteriner hekimler, tıp doktorları, ulusal otorite mutlaka elde edilen veriler

konusunda bilgilendirilmelidir. Uygulanan antibiyotik duyarlılık testleri uluslararası standartlara göre uygulanmalı ve mutlaka kalite kontrol protokollerine uyulmalıdır.

4. Gıda amaçlı üretilen hayvanlarda kullanılacak antimikrobiyaller için ulusal kullanım düzeyleri belirlenmelidir. Veteriner hekimler için antibiyotik kullanımı protokolleri oluşturulmalı ve tüm antimikrobiyallerin kullanımında veteriner hekim tarafından reçetelendirme mecburi kılınmalıdır.

5. İnsanlarda tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler ile aynı gruba üye antimikrobiyal büyütme faktörlerinin kullanımı yasaklanmalıdır.

6. Mezuniyet öncesi ve sonrası eğitim programları düzenlenerek veteriner hekimlerin bu konuda ve özellikle koruyucu hekimlik uygulamaları ve yaratacağı halk sağlığı problemleri açısından bilgilendirilmesi, bilinçlendirilmesi sağlanmalıdır.

Yine aynı dokümanda hayvanlarda direncin ortaya çıkışında;

1. Antibiyotik kullanan veteriner hekimlerin antimikrobiyal direnç ve uygun antibiyotik kullanımı konusunda yeterli bilgiye sahip olmamasını,

2. Bazı ülkelerde antibiyotik satışlarından veteriner hekimlerin gelir elde etmesini,

3. Antibiyotiklerin tedavi amaçlı kullanılması yerine üretim amaçlı kullanılmasını,

4. Yeterli antibiyotik uygulama ve kontrol kurallarının olmamasını,

5. Üretici kuruluşların pazarlama stratejilerinin veterinerleri ve hayvan üreticilerini etkilemesini,

6. Endüstriyel hayvan üretiminin anlamlı düzeyde artmasını,

7. Ekonomik kaygıların oluşacak direncin insan sağlığına olan etkisinin önüne geçmesini,

8. Birçok ülkede hayvan ve hayvan kaynaklı gıdalarda direnç takip programlarının uygulanmamasını etkili olan faktörler olarak vurgulamışlardır.

Antibiyotiklerin hayvancılıkta büyütme faktörü olarak kullanımının yanında tedavi ve profilaktik amaçlı kullanımı sürmektedir. Tarım ve Köyişleri ile Sağlık Bakanlığı'nın birlikte çıkardıkları "Türk gıda kodeksi hayvansal kökenli gıdalarda veteriner ilaçları maksimum kalıntı limitleri tebliği" (Tebliğ no: 2002/30, Tarih 28.04.2004-24739) ile et, süt, yumurta, bal gibi hayvansal kökenli tüm gıdalarda

bulunabilecek enfeksiyon tedavisi/profilaktik amaçlı kullanılan antibiyotiklere ait farmakolojik aktif maddelerin maksimum kalıntı limitleri yayınlanmıştır. Ancak ne yazık ki bu konuda gerektiği şekilde kontrol uygulaması yapılamamaktadır. Örneğin; gelişme döneminde antibiyotikli yemle beslenen hayvanların kesimden yedi-on gün önce antibiyotiksiz yeme geçme zorunluluğu vardır. Bu dönemde enfekte olan hayvanların imhası ve enfekte hayvanlardan elde edilen ürünlerin satışa sunulmaması gerekmektedir. Meydana gelebilecek maddi kaybı en aza indirmek için antibiyotiksiz yem dönemi kısa tutulmakta ve kesim sonrası yeterli düzeyde kalıntı kontrolü yapılamamaktadır. Yine tavuk üretiminde kümeslerde metre kareye düşen kilo miktarı arttığı zaman, antibiyotikli yemleme döneminde kümesteki hayvanları seyreltmek amacıyla erken kesimler yapılmakta ve bu hayvanlardan elde edilen etler satışa sunulabilmektedir (Başustaoğlu, 2004).

İnsan ve hayvanlarda enterokok enfeksiyonlarının çoğu endojen kökenli olup, barsaklardan translokasyonla endojen kökenli sistemik enfeksiyona dönüşür. Ancak, hastanelerde ve hayvan barınaklarında, kolonize hasta veya hayvan ile kontamine atıklarla direkt temasla, personelin kontamine elleriyle kontamine yüzeylerle temasla veya kontamine tıbbi aletler yoluyla indirekt olarak bulaşan olduğu gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonların da enterokok enfeksiyonlarının, özellikle de tedaviye cevap vermeyen VRE/GRE gibi çoklu ilaç direnci gösteren suşlarla oluşan enfeksiyonların, 1980’li yıllardan sonra artış trendine girmesi ile Center for Disease Control and Prevention (CDC)’ ye bağlı “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee” (HICPAC) hastanelerde VRE yayılımını kontrol altına alabilmek amacı ile alınması gereken tedbirleri içeren bir rehber 1995 ve 1996 yıllarında yayınlamıştır. Bu rehberde önerilen tedbirler;

#### 1) Hastane personelinin eğitimi

Doktor, hemşire, hasta bakımından sorumlu personel, laboratuvar çalışanları, eczacılar ve öğrenciler gibi bütün hastane çalışanlarına VRE’nin önemi, epidemiyolojisi ve kontrolünün dair eğitim verilmelidir. VRE kontrol yöntemleri ve VRE yayılımını önleyici ilkeler konusunda düzenli olarak yılda en az bir kez eğitim yapılmalı ve VRE sıklığında artış olduğunda bilgi yenileme eğitimi şeklinde tekrarlanmalıdır (Manley ve ark., 2007).

## 2) Kısıtlı vankomisin kullanımı

Dirençli mikroorganizmaların kontrolünde antibiyotik kullanımının kısıtlanması son derece önemlidir. Hastanelerde uygun olmayan endikasyonlarda vankomisin kullanımı VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca üçüncü kuşak sefalosporinler ve anti-anaerobik etkinliği olan antibiyotiklerin kullanımı da riski artırmaktadır. Bu sebeple özellikle VRE kontrolünde antibiyotik kullanımı konusunda eğitim çalışmalarına önem verilmeli, HICPAC önerileri dikkate alınmalıdır (Manley ve ark., 2007).

## 3) Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı

Mikrobiyoloji laboratuvarı tüm hastane enfeksiyonlarında olduğu gibi VRE sürveyansında ve yayılımının önlenmesinde oldukça önemli bir basamaktır. VRE ile kolonize veya enfekte hastaların en kısa sürede ve doğru olarak tespit edilmesi, duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi, kontrol önlemlerinin erken dönemde uygulanabilmesini ve yayılımın sınırlandırılmasını sağlar. Bir hastanede VRE bir kez izole edildiğinde mutlaka vankomisin duyarlılığı yönünden tekrar test edilmesi ve enfeksiyon kontrol komitesine ve hastanın izlendiği servise bildirilmesi gerekir. Böylece sonuç belli olana kadar hastanın izole edilmesi sağlanmalıdır. Rutin tarama kültürleri ile kolonizasyonun tespiti ve izole edilen VRE suşları arasındaki klonal ilişkinin moleküler tipleme yöntemleri ile ortaya konulması da enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önem taşımaktadır (Manley ve ark., 2007).

## 4) Sürveyans kültürleri

İntestinal kolonizasyonunun belirlenmesi amacıyla sürveyans kültürlerinin alınması VRE kontrol proGramının en önemli basamaklarından birisidir. Prevalans taramaları yeni bir VRE pozitif hasta tespit edildiğinde sadece aynı odada izlenmekte olan hastaların taraması ile sınırlı olabileceği gibi, aynı servisteki bütün hastaların veya yoğun bakım, transplantasyon, hematoloji onkoloji ünitesi gibi birimlerde izlenen yüksek risk grubundaki hastaların taranması şeklinde daha geniş kapsamlı olabilir. Kolonizasyon tespitinde diğer bir yaklaşım ise *C. difficile* toksini araştırılmak üzere gönderilen gaitaların VRE yönünden taranmasıdır. Ayrıca VRE'nin yaygın olduğu hastanelerden veya bakımevlerinden transfer edilen hastalardan perirektal kültür alınması da diğer bir uygulamadır (Manley ve ark., 2007).

##### 5) Gastrointestinal kolonizasyonun eradikasyonu

Vankomisin dirençli enterokok eradikasyonunda amaç, kolonizasyonu olanlarda enfeksiyon gelişme riskini azaltmak, hastanedeki VRE rezervuarını sınırlamak ve enfeksiyon kontrolüne yönelik harcamaları azaltmaktır. Ancak kalıcı eradikasyon sağlayacak antimikrobiyal tedavi henüz bilinmemektedir. VRE kolonizasyonunun eradikasyonunda, *Lactobacillus rhamnosus* içeren yoğurt kullanılmış ve başarılı bulunmuştur (Manley ve ark., 2007).

Vankomisin dirençli enterokoklar ile kolonize hastalarda spontan dekolonizasyon nadir olarak oluşmaktadır. Mayor Klinikte yapılan bir çalışmada; karaciğer ve böbrek transplantasyonu yapılmış hastalarda spontan dekolonizasyon oranı %34 bulunmuştur. Oral basitrasin, ramoplanin ve novobiyosin gibi antimikrobiyallerin kullanımı VRE eradikasyonunda kısıtlı başarı göstermiştir (Çetinkaya ve ark., 2000; Zırakzadeh ve Patel, 2006).

##### 6) Korunma ve kontrol

Hastane içerisinde hastalar arasında enterokok yayılımında, temasın engellenmesi yani izolasyon en önemli korunma yöntemidir. Teması ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için; sağlık personeli arasında el antiseptisi, eldiven ve koruyucu önlük kullanımı gibi uygulamalar yaygınlaştırılmalı ve özendirici tedbirler alınmalıdır. Yapılan çalışmalarda hastane personelinin ellerinin hastalar arası bulaşta önemli bir vektör olduğu gösterilmiştir. Maryland Üniversitesi'nde yoğun bakım ünitelerinde aktif sürveyans uygulanmasının VRE geçişini %39 oranında azalttığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada önlük kullanımının 400.000 dolardan fazla yıllık tasarruf sağladığı bildirilmiştir (Başustaoğlu, 2004; Zırakzadeh ve ark. 2006).

Bir VRE salgınında salgının önlenmesi amacı ile;

a) VRE ile enfekte veya kolonize hastalar tek kişilik odalara veya VRE pozitif diğer hastalarla aynı odaya yerleştirilmeli,

b) VRE pozitif hasta odasına girerken eldiven ve önlük giyilmeli; hasta odasından ayrılmadan önce eldiven ve önlük çıkarılıp eller antiseptik ajanlarla yıkanmalı ve eller yıkandıktan sonra hasta odasındaki yüzeylerle temas edilmemeli,

c) VRE pozitif hastalarda kullanılan tıbbi aletler diğer hastalar için kullanılmamalı, ortak kullanılacaksa dezenfekte edilmeli ve odalar arası eşya transferinden kaçınılmalı,

d) VRE pozitif hasta ile aynı odada izlenen hastalardan gaita veya rektal sürüntü kültürleri alınarak kolonizasyon yönünden araştırılmalı ve VRE kolonizasyonu uzun süre devam edebildiği için, en az bir hafta arayla alınmış üç veya daha fazla negatif kültür sonucu elde edilene kadar araştırmaya devam edilmelidir.

e) VRE yayılım şekillerini ve rezervuarı belirlemek amacıyla uygun moleküler yöntemler kullanılarak klonal ilişki yönünden değerlendirilmelidir.

f) Sağlık personelinde VRE taşıyıcılığı ve buna bağlı VRE yayılımı bildirilmiş olmakla beraber sağlık personelindeki taşıyıcılık VRE için tanımlanmış önemli bulaş yollarından biri değildir. Ancak VRE yayılımı kontrol altına alınamıyorsa, sağlık personeli kronik cilt ve tırnak problemleri yönünden incelenmeli, epidemiyolojik olarak VRE yayılımı ile ilişkili olduğu belirlenen VRE taşıyıcısı personelin VRE negatif hastalara bakım hizmeti vermesinden kaçınılmalıdır (HICPAC, 1995; Kim ve ark., 2003; Alp ve Şardan, 2008; Tacconelli ve Cataldo, 2008).

## 2.11. Tavuklar ve Özellikleri

Tavuksular (*Galliforme*), kuşlar sınıfına ait tavuklar, sülünler ve hindiler gibi kuşları kapsamaktadır (Tablo 5). İlk olarak Hindistan orijinli tavuklar evcilleştirilmiştir (Garrigus, 2007). Tavuklar, 2003'teki oranlara göre 24 milyardan fazla sayıya sahiptir ve bu oran onları dünyadaki en geniş popülasyona sahip evcil hayvan grubu yapmaktadır (Perrins, 2003).

Tavuklar uçamayan kuşlardandır. Boyları kısa ya da orta uzunlukta olan yerde yaşayan tipik zemin kuşlarıdır. Ayakları eşelemeye ve koşmaya uygundur. Çoğunlukla başlarında tüysüz kısımlar ya da ibik benzeri deri çıkıntıları bulunur. İbikler erkeklerde daha büyüktür. Gagaları kısa ve kuvvetli, ucu genellikle aşağı doğru kıvrıktır. Bacakları kısa, eşelenmeye ve yürümeye uyum sağlamıştır. Ayaklarında, üçü önde, biri arkada olmak üzere dört parmak vardır. Gözleri başının iki yanında olup, üçer göz kapağına sahiptir. Üçüncü perde gözü fazla ışıktan korur. Kuyruk, özellikle erkeklerde iyi gelişmiştir. Horozlarda büyük, tavuklarda küçüktür. Küçük kanatlı olduklarından ancak

kısa mesafede uçuş yapabilirler. Mideleri diğer kuşlarda olduğu gibi üç bölümdür. Yemler önce kursağa, sonra ön mideye geçer. Son olarak katıda sindirilir. Tavuklar yuva yapmaz. Yerde veya ağaç dallarında tünerler. Sıcakkanlı hayvanlardır. Genel olarak vücut ısıları 40,5-42<sup>0</sup>C'dir. Akciğer solunumu yaparlar (Perrins, 2003; Garrigus, 2007).

Sürüler halinde yaşarlar. Evcil olarak kümeslerde yaşarlar ancak serbest yaşayan yabani türler de vardır. Yuvalarını toprak üzerine, çalılardan arasına yaparlar. Yalnız dişiler kuluçkaya yatar. Evcilleştirilmiş pek çok türü bulunur. Ortalama ömürleri 15-20 yıldır (Perrins, 2003; Garrigus, 2007).

Hepçil hayvanlardır. Besinleri taneli tohumlar, bitkiler ve böceklerdir. Besinleriyle birlikte taşlıklarında bulunması için taş da yutarlar. 2003 yılında 24 milyar nüfus ile Dünya'da en fazla bulunan kuş türüdür. İnsanlara iki çeşit sık kullanılan besin kaynağı etleri ve yumurtaları sunarlar (Rales 2010).

Yumurta ile çoğalırlar. İyi bir tavuk yılda 250-300 yumurta verir. Aralık ve ocak aylarında tüy değiştirdiklerinden yumurtlamazlar. Horoz tarafından döllenmiş yumurtalardan civciv çıkar. Döllenmemiş yumurtalardan civciv çıkmaz. Yumurtalıkta meydana gelen yumurta sarısı, yumurtalık kanalından geçerken üst kısımdan salgılanan yumurta akına bulanır. Aşağı inerken de üstü kireçlenir. Bu yumuşak kabuk havayla temas edince sertleşir. Kuluçkaya yattıklarında yumurtaları çevirerek devamlı hepsine aynı ısıyı vermeye çalışırlar. 38 ve 41 derecelerde de civciv çıkabilir. En ideal ısı 39-40 derecedir. Vücutları küçük olan tavukların ısıları iri tavuklardan fazladır. Böyle tavuklar daha erken civciv çıkarır. Tavukta kuluçka süresi genel olarak 21 gündür. Leghorn tavuklarının vücutları küçük, hararetiyse fazla olduğundan 20 günde civciv çıkarırlar (Perrins, 2003; Garrigus, 2007).

Tavuklar hayatlarının farklı evrelerinde farklı isimler alırlar. Yeni doğmuş yavrularına civciv, genç ve gelişme çağında olanlara piliç, yumurtlama olgunluğuna henüz ulaşmamış, ergenlik öncesi dönemdeki dişiye yarka, cinsi olgunluğa ulaşmış ergin dişilere tavuk, ergin erkekler horoz denir (Perrins, 2003; Garrigus, 2007).

Dünyada ve Türkiye’de Leghorn, Arden, Nemse, Fizan, Minorka, Dorking, Beç, Denizli, Cebeci, Gerze, İспенç tavuğu ve Tepeli tavuk en meşhur tavuk cinsleridir (Perrins, 2003; Garrigus, 2007).

**Tablo 5.** Tavukların sınıflandırılması

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| Alem    | Animalia (Hayvanlar)     |
| Şube    | Chordata (Kordalılar)    |
| Sınıf   | Aves (Kuşlar)            |
| Takım   | Galliformes (Tavuksular) |
| Familya | Phasidae (Sülüngiller)   |
| Cins    | <i>Gallus</i>            |
| Tür     | <i>G. gallus</i>         |
| Alt Tür | <i>G. g. domesticus</i>  |

## 2.12. Martılar ve Özellikleri

Herkesin bildiği deniz kuşları olarak anılır. Martıgiller, Deniz kırlangıcıgiller, Yırtıcı martıgiller ve Dalıcı martıgiller familyalarını kapsar (Şekil 8; Tablo 6). Martıgiller familyasından olan bu kuşlar, denizi olan tüm dünya topraklarında yaşayabilen özelliklere sahip uçucu ve yüzücü kuşlardır. Çöllerde ve kutuplarda rastlanmazlar. Ağırlıkları, türe bağlı olarak, 150 gr ile 1,5 kg arasında değişir. Boylarında ağırlıkları gibi türden türe değişim gösterir. Küçük türlerin boyu 35 cm, büyük olanların ise 70 cm civarındadır. Sivri ve uzun kanatları olan, yüzme ve uçuş yeteneği gelişmiş, perde ayaklı bir kuş türüdür. Genellikle toplu halde deniz kıyısı olan yerlerde yaşarlar. Oldukça sosyal bir yapıya sahip olan kuşlar, insanlarla iç içe yaşamayı sever. Denizden uzak yaşayamazlar. Ortalama yaşam süreleri 25 yıl kadardır.

Çirkin bir sese sahip olan martılar, zarafetten ödün vermeyen yapılarıyla dikkat çeker. Kafa bölgesindeki tüyler kışın beyazlaşırken, yazın daha koyulaşır. Tüylerinin rengi beyaz, siyah ya da kül rengindedir. Kanatlarının büyüklüğü iyi uçuşmasına yardımcı olur. Suyun içine dalma özellikleri olmadığından, en kötü koşullarda bile denizin üzerinde yüzerek, dinlenirler. Gaga yapıları orta bölüme kadar düz inerken, uç kısma doğru kanca şeklini alır. Kuyrukları genellikle çatallı, ayakların ön parmakları perdeli, arka parmakları ise perdesizdir.

Denizin yüzeyinden ve kıyılarından beslenirler. Oldukça iştahlıdırlar. Yedikleri böcekler, leşler, yumuşakçalar ve çöplükteki artık yiyeceklerdir. Yedikleri arasında plastik olursa, sürekli tokluk hissi duyacaklarından ölüme kadar giden bir süreç yaşarlar. Çöplerin olduğu kıyı kesimlerinde bu kuşlardan bol miktarda bulunur.

Martılarda üreme özelliklerine bakıldığında toplu olarak yaşarlar, yuva yapmak için bataklık kıyılarını, evlerin çatılarını, göl ve deniz kenarlarını tercih ederler. Muntazam yapılmamış olan yuvaları, yosunlarla örtülüdür. Dişiler 2-3 adet arası yumurta yaparak, 3-4 hafta süresince kuluçkada yatar. Kuluçkayı, erkek ve dişi nöbetleşe olarak yapar. Yumurtalar kahverengi veya siyah beneklidir. Yavrular ilk çıktığında esmer olarak doğar. Yavruları ve yuvayı korumakta da erkek ve dişi birlikte hareket eder. Anne ve babasının gagasına vurarak açlığını anlatan yavrular, 4-6 haftalık olduğunda yuvadan uçarlar.

Oldukça fazla türleri bulunmaktadır. Yaklaşık 45 tür altında toplanan martılar (*Laridae* altfamilyası) sumrularla birlikte *Laridae* familyasını oluşturur. Martıların pek çok türü olup cüce martı, gümüşsel martı, küçük martı, kara martı, karabaşlı martı, kara kuyruklu martı, Kırlangıç kuyruklu martı, güler martı, Kara bacaklı martı ve Franklin martısı en meşhur martı türleridir.

Ada martısı (*Larus audouinii*): Koloniler halinde kıyıdan uzaktaki adalarda ve kayalık bölgelerde yaşarlar. Deniz yüzeyinden 1000 metre kadar yüksekliklerde yaşarlar. Üreme için orta yükseklikte bitki örtülerini seçerler. Nisan ortasından Mayıs başlarına kadar çiftleşme ve yumurtlama dönemidir. Temmuz başında çıkan yavrular, yuvadan uçtuğunda kolonilerin içine karışırlar. Bu türlerin avlanması yasaklanmıştır. Akdeniz kıyılarında, özellikle Mersin Silifke yöresinde bulunurlar.

Büyük kara sırtlı martı (*Larus marinus*): Uzunluğu 75 santimetreye ulaşan en iri martı türüdür. Sivri ucu aşağı doğru kıvrılan sarı, güçlü gagası yengeçleri, balıkları, fare ve sıçan gibi küçük memelileri, plastik çöp torbalarını kolayca parçalayabilir. Bunun dışında yelkovankuşları ve deniz papağanları gibi küçük kuşları ve kuzuları da kaptığı bilinmektedir. Türkiye de bulunan martı türlerindendir.

Küçük martı (*Larus minutus*): Gerçekten martıların en küçük türüdür. Uzunluğu ender olarak 30 santimetreyi aşan bu türün başı siyah, kanatlarının üstü açık gri, altı daha koyudur. Türkiye'de yazın az sayıda ürer.

Karabaş martı (*Larus ridibundus*): Yazın koyu kahverengi olan başı, kışın beyazlaşır. Türkiye'de bütün kıyı bölgelerinde ve iç kesimlerdeki göllerde ürer.

Bayağı martı (*Larus argentatus*): Avrupa kıyılarının yanı sıra Türkiye'de de en yaygın martı türüdür. Bunun dışında Güney Amerika ve Avustralya dışında tüm kıtaların kıyılarında bulunur. Bayağı martının uzunluğu 60 santimetredir. Bazen midye gibi kabuklu hayvanları gagasına sıkıştırıp kabuklarını kırmak için yükseklerden kayalara bırakan bu martılar hemen her şeyi yer.

Gümüş martı (*Larus cachinnans*): Ülkemizde az da olsa rastlanan türlerdir. Grimsi renkleriyle tanınırlar.

Californiya martısı (*Larus californicus*): Bayağı martıya çok benzeyen bu tür büyük ölçüde ABD'nin Büyük Okyanus kıyılarında yaşar.

Pasifik martısı (*Larus pacificus*): Avustralya'nın güneyinde ve Tasmanya'da üreyen bazı diğer martılar gibi, çeşitli deniz kuşlarının yuvasından ayrılmasını fırsat bilip yumurtaları ve yavruları yağmalar.

Okyanus martısı (*Rissa tridactyla*): Gürültücü koloniler halinde, Atlas Okyanusu'nun her iki kıyısındaki sarp kayalıklara yuvalanır. Martılar için alışılmadık ölçüde düzenli yuvaları ot ve yosun gibi bitkisel maddelerden oluşur. Ayaklarının siyah olması da bu türün dikkat çeken özellikleri arasındadır.

Yırtıcı martılar: Akraba bir familyayı (*Stercorariidae*) oluşturan martılardır, yiyeceğini sık sık diğer kuşlardan kaparak elde eden, koyu renkli, martıyı andıran kuşlardır. Bu grubun en iri türü olan büyük yırtıcımartı (*Catharacta skua*) yaklaşık 60 cm uzunluğunda, siyahımsı kahverengi tüylü, kalın gövdeli, güçlü yapılı ve kısa kuyrukludur. Kıvrık tırnaklarla donanmış parmakları ayaklarına pençe görünüşü verir. Hem Kuzey Kutup Bölgesi'nde, hem de Antarktika'da üreyen tek kuş türüdür. Uzun süre hızla ve yorulmadan uçabilir. Yalnız yaşadığı gibi yalnız avlanmayı yeğler. Peşine

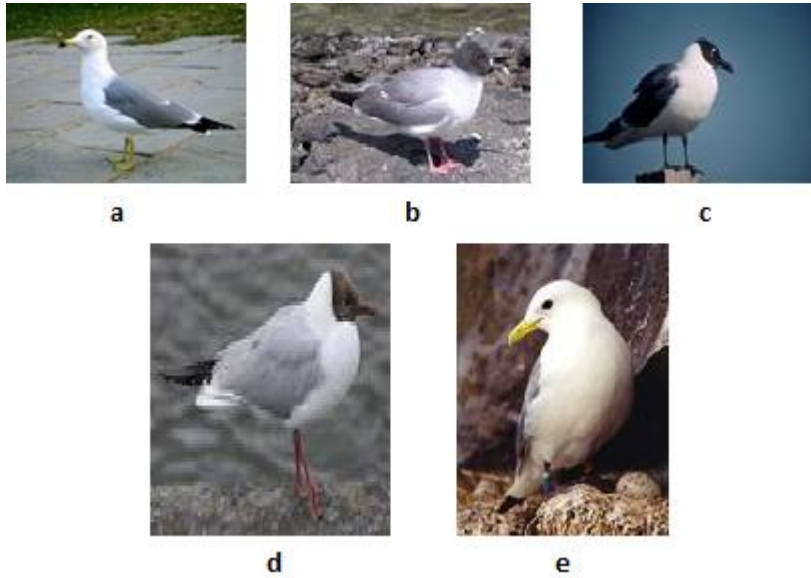
düşükleri martıları yakaladıkları balıkları bırakmaya zorladıklarından “korsan martılar” olarak da tanınırlar.

Büyük dalıcı martılar: Üreme mevsimi boyunca kendi yiyeceklerini bulurlar. Kuzey ve Güney kutupları yakınlarında üreyen topluluklar birbirinden ayrıdır. Fakat üreme mevsimi dışında yeryüzünün her yerine dağılırlar. Yumurtalarını ve yavrularını yabancılara karşı etkin bir biçimde koruyan bu kuşlar bölgelerine giren canlılara ayırım gözetmeksizin saldırırlar. Diğer yırtıcı martıların davranışları da benzer özellikler gösterir. Yazın Kuzey Kutbu'na yakın tundralarda ve adalarda ürer, kışın Şili, Güney Afrika ve Avustralya'ya kadar göç ederler. Ayrıca, bir grup deniz kuşu “dalıcı martı” adıyla tanınmaktadır.

Dünyada ve Türkiye’de bilinen Martı türlerinin isimleri aşağıda verilmiştir;

- Ada martısı (*Larus audouinii*) (Türkiye)
- Akdeniz martısı (*Larus melanocephalus*) (Türkiye)
- Amerika ringa martısı (*Larus smithsonianus*)
- And martısı (*Larus serranus*)
- Arduvaz sırtlı martı (*Larus schistisagus*)
- Batı martısı (*Larus occidentalis*)
- Belcher martısı (*Larus belcheri*)
- Beyaz gözlü martı (*Larus leucophthalmus*) (Türkiye)
- Bonaparte martısı (*Larus philadelphia*)
- Boz martı (*Larus modestus*)
- Büyük kara sırtlı martı (*Larus marinus*) (Türkiye)
- Büyük karabaş martı (*Larus ichthyaetus*) (Türkiye)
- California martısı (*Larus californicus*)
- Deniz martısı (*Larus novaehollandiae*)
- Doğu martısı (*Larus armenicus*) (Türkiye)
- Doğu Sibirya martısı (*Larus vegae*)
- Franklin martısı (*Larus pipixcan*)
- Gri başlı martı (*Larus cirrocephalus*)
- Gülen martı (*Larus atricilla*)
- Gümüş martı (*Larus cachinnans*) (Türkiye)

- Halka gagalı martı (*Larus delawarensis*)
- Hartlaub martısı (*Larus hartlaubii*)
- Heermann martısı (*Larus heermanni*)
- Heuglin martısı (*Larus heuglini*)
- İnce gagalı martı (*Larus genei*) (Türkiye)
- İslı martı (*Larus hemprichii*)
- İzlanda martısı (*Larus glaucoides*)
- Kahverengi başlıklı martı (*Larus maculipennis*)
- Kahverengi-başlı martı (*Larus brunnicephalus*)
- Kara gagalı martı (*Larus bulleri*)
- Kara kuyruklu martı (*Larus crassirostris*)
- Kara sırtlı martı (*Larus fuscus*) (Türkiye)
- Karabaş martı (*Larus ridibundus*) (Türkiye)
- Kızıl gagalı martı (*Larus scopulinus*)
- Küçük gümüş martı (*Larus canus*) (Türkiye)
- Küçük martı (*Larus minutus*) (Türkiye)
- Kutup martısı (*Larus hyperboreus*) (Türkiye)
- Kuzey gümüş martı (*Larus argentatus*) (Türkiye)



**Şekil 8:** Bazı martı çeşitleri.

a: Kara kuyruklu martı (*Larus crassirostris*) b: Kırlangıç kuyruklu martı (*Creagrus furcatus*) c: Gülen martı (*Larus atricilla*) d: Karabaş martı (*Larus ridibundus*) e: Kara bacaklı martı (*Rissa tridactyla*)

**Tablo 6.** Martıların sınıflandırılması

|          |                                                                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alem     | Animalia (Hayvanlar)                                                                                     |
| Şube     | Chordata (Kordalılar)                                                                                    |
| Sınıf    | Aves (Kuşlar)                                                                                            |
| Takım    | Charadriiformes ( Yağmur kuşlar)                                                                         |
| Familiya | <i>Laridae</i> (Martıgiller)                                                                             |
| Cins     | <i>Larus</i><br><i>Rissa</i><br><i>Pagophila</i><br><i>Rhodostethia</i><br><i>Xema</i><br><i>Creagus</i> |

### 2.13. Çalışmanın Amacı

Van ili ve çevresindeki kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin yapıldığı tavuklarda ve Van Gölü Havzasında serbest olarak yaşayan martılara ait dışkı örneklerinde enterokok türlerinin varlığı-yaygınlığının belirlenmesi ile izolatların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri açısından fenotipik ve genotipik analizinin yapılması amaçlandı. Ayrıca, araştırmada tavuk ve martılardan izole edilen enterokok türleri antibiyotik direnç patternleri bakımından fenotipik ve vankomisin dirençlilik genleri açısından ise genotipik olarak incelendi.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

Çalışmanın materyalini, Haziran-Eylül 2013 tarihleri arasında Van ili ve çevresindeki kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmelerdeki tavuklardan ve Van Gölü Havzasında martıların yoğun yaşadığı yerlerden toplanan dışkı örnekleri oluşturdu. Araştırma için dört ay boyunca tavuk ve martı sürülerinin yoğun ilişki kurduğu pilot bölgelerde takip yapıldı.

##### **3.1.1. İzolasyon materyali**

Çalışmada, enterokok türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla tavuklardan 500 ve martılardan 500 olmak üzere toplam 1000 dışkı örneği toplandı (Tablo 7). Tavuklardan toplanan dışkılar, köy işletmelerindeki kümeslerden taze olmasına dikkat edilerek toplandı. Martı dışkıları, sürüler halinde bulunan martı toplulukları takip edildi ve martılar uçtukten sonra alanda bulunan taze dışkılardan örnekleme yapıldı. Dışkı örnekleri azide dextrose broth (AZB) içerisinde soğuk zincirde taşındı (Şekil 9).

**Tablo 7.** Tavuk ve martı dışkı örneklerinin toplandığı bölgeler ve örnek sayıları

| <b>Bölge</b>                            | <b>Tavuk</b> | <b>Martı</b> | <b>Toplam</b> |
|-----------------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| <b>1.Adır Adası ve Sahil Köyleri</b>    | <b>150</b>   | <b>250</b>   | <b>400</b>    |
| Yaylıyaka Köyü                          | 50           | 100          | 150           |
| Kumluca Köyü                            | 50           | 50           | 100           |
| Yeşilsu Köyü                            | 50           | 50           | 100           |
| Adır Adası                              | -            | 50           | 50            |
| <b>2. Erçek Gölü ve Sahil Köyleri</b>   | <b>100</b>   | <b>100</b>   | <b>200</b>    |
| Erçek Beldesi                           | 20           | 20           | 40            |
| Karagündüz Köyü                         | 20           | 20           | 40            |
| Aşağıgölalan köyü                       | 20           | 20           | 40            |
| Baklatepe Köyü                          | 20           | 20           | 40            |
| Gendelova Köyü                          | 10           | 10           | 20            |
| Gölyazı Köyü                            | 10           | 10           | 20            |
| <b>3.Sihke Gölü ve Çevresi</b>          | <b>100</b>   | <b>100</b>   | <b>200</b>    |
| Kurtuluş Caddesi boyu                   | 50           | 50           | 100           |
| Beyüzümü Mahallesi                      | 50           | 50           | 100           |
| <b>4.Edremit ve Gevaş Sahil Köyleri</b> | <b>100</b>   | <b>100</b>   | <b>200</b>    |
| Uğurveren Köyü                          | 20           | 20           | 40            |
| Dilkaya Köyü                            | 20           | 20           | 40            |
| Enginsu Köyü                            | 20           | 20           | 40            |
| Akdamar Beldesi                         | 20           | 20           | 40            |
| Yuva Köyü                               | 20           | 20           | 40            |
| <b>Toplam</b>                           | <b>500</b>   | <b>500</b>   | <b>1000</b>   |



**Şekil 9.** Tavuk ve martı dışkı örneklerinin Azide Dextrose Broth'daki görüntüsü

### 3.1.2. Besiyerleri

Dışkı örneklerinden enterokokların izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla azide dextrose broth (ADB, MERCK), bile eskuline agar (BEA, HIMEDIA), blood agar base (HIMEDIA), brain heart infüsiyon broth (BHIB, PLASMATEC), triptic soy agar (TSA, PLASMATEC), ve mueller-hinton agar No.2 (MHA, HIMEDIA) besiyerleri kullanıldı. Besiyerleri prospektüslerine uygun olarak hazırlandı.

### 3.1.3. Referans enterokok suşları

Vankomisin dirençli referans suşlar;

- *E. faecium* BM 4147 (*vanA*)
- *E. faecalis* V583 (*vanB*)
- *E.gallinarum* BM 4174 (*vanC1*)
- *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC2*)

İnönü Üniversitesi Turgut ÖZAL Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edildi.

### 3.1.4. Antibiyotik diskleri

İzole ve identifiye edilen suşların antibiyotik dirençlilikleri/duyarlılık durumları tespit edilmesi amacıyla Bioanalyse firmasından sağlanan vankomisin (VA, 30), teikoplanin (TEC, 30), levofloksasin (LEV, 5), piperasillin (PRL, 100), kloramfenikol (C, 30), meropenem (MEM, 10), imipenem (IPM, 10), kanamisin (K, 10), penisillin G (P, 10U), oksasillin (OX, 1), sefazolin (CZ, 30), sefuroksim (CXM, 30), sefadroksil (CFR, 30), sefoksitin (FOX, 30), sefoperazon (CEP, 75), sefklor (CEC, 30), sefepim (FEP, 30), sefalothin (KF, 30), tobramisin (TOB, 10), sefpodoksım (CPD, 10), sefotaksim (CTX, 30), sefprozil (CPR, 30), streptomisin (S, 10), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1.25/23.75), seftizoksım (ZOX, 30), tetrasiklin (TE, 30), ampisilin (AM, 10), basitrasin (B, 10U), eritromisin (E, 15), fusidik asid (FA, 10), gentamisin (CN, 10), amikasin (AK, 30) standart antibiyotik diskleri kullanıldı.

### 3.1.5. PCR araç ve gereçleri

Qiagen DNA Mini Extraction Kit, Vivantis DNA Amplification Product Taq DNA Polymerase, AppliChemAgarose low EEO, BioLabs N3231S 100bp DNA Ladder, Hettich Soğutmalı Santrifüj, Hettich Soğutmalı Mikrosantrifüj, BiosanCombi-Spin Mikrosantrifüj, Gel Logic 2200 ImagingSystem Jel görüntüleme sistemi, AppliedBiosystemsGeneAmp PCR System 9700, QiagenQiagility Liquid Handling System (Qiagility Sıvı Denetim Sistemi), Consort E 452 Yatay Elektrophorez Sistemi, Kottermann Su banyosu, Binder İnkübatör ve Vestel Mikrodalga Fırın kullanıldı.

#### PCR çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler;

| PCR mix içeriği   | Stok konsantrasyon | Tüp konsantrasyon | Örnek başına gerekli miktar |
|-------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|
| H <sub>2</sub> O  |                    |                   | 15.95 µl                    |
| ViBuffer A        | 10X                | 1X                | 2.5 µl                      |
| MgCl <sub>2</sub> | 50mM               | 1.5mM             | 0.75 µl                     |
| dNTP's            | 10mM               | 0.4mM             | 1 µl                        |
| ForwardPrimer     | 10 µM              | 0.4µM             | 1 µl                        |
| ReversePrimer     | 10 µM              | 0.4µM             | 1 µl                        |
| Taq DNA Polimeraz | 5 U/µl             | 1.5 U             | 0.3 µl                      |
| Kalıp DNA         | 0.04 µg/ µl        | 0.2µg             | 2.5 µl                      |
| Toplam Volüm      |                    |                   | 25 µl                       |

10x, pH 8,0 hazırlanışı aşağıda anlatıldığı şekildedir;

- 121,1 gr Tris Base (Sigma)
- 55,55 gr borik asit
- 3,8 gr EDTA birlikte 1000 ml'ye tamamlanarak buzdolabında saklandı.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. İzolasyon**

Tavuk ve martılardan, steril toplama kaplarına alınan dışkı örnekleri transport ve ön zenginleştirme amacıyla ADB içerisinde soğuk zincirde ve kısa sürede Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji laboratuvarına getirildi. 37<sup>0</sup>C'de ve 24-48 saat inkubasyondan sonra, bu besiyerinden BEA'a ekim yapılarak aynı şartlarda inkubasyona bırakıldı. Sham ve ark., (1997), Khan ve ark., (2005), Doğru ve ark., (2010b), Ünal ve ark., (2010) bildirdikleri yöntem kullanarak eskulin pozitif (siyah renkli) kolonilerden, Gram pozitif, katalaz negatif, kok morfolojisinde ve PYR testi pozitif olanlar %7 koyun kanlı agara ekilerek saflaştırıldı. İzole edilen suşlar, tür tayini ve sonrasında moleküler karakterizasyon için %10'luk BHIB'da -20<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### **3.2.1. İdentifikasyon**

İzole edilen enterokok şüpheli bakterilerin cins ve tür tayinleri Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteriyoloji laboratuvarında BD Phonenix otomatik mikrobiyoloji sistemleri (Becton Dickinson, USA) kullanılarak Gram pozitif panellerde yapıldı.

-20<sup>0</sup>C'de %10'luk BHIB'da saklanan suşlardan, %7'lik koyun kanlı agara ekimler yapıldı ve 37<sup>0</sup>C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. %7'lik koyun kanlı agarda üremiş saf kolonilerden 0,5 McFarland olacak şekilde bakteriyel süspansiyon hazırlandı ve Gram pozitif panelin identifikasyon kısmına usulüne uygun aktarıldı. BD Phonenix otomatik mikrobiyoloji sistemine, hazırlanan Gram pozitif panel yerleştirildi. 24 saat sonra identifikasyon sonuçları değerlendirildi.

### 3.2.3. Moleküler karakterizasyon

İzole ve identifiye edilen enterokok türlerinin single-PCR ve Multiplex PCR-RFLP ile moleküler karakterizasyonu İnönü Üniversitesi Turgut ÖZAL Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu amaçla izole ve identifiye edilen enterokok türlerinin cins ve tür düzeyinde doğrulanması 16S *rRNA* (320 bp) hedef alınarak PCR ile yapıldı. Her tür için *esp* geni (Enterokokal yüzey protein) hedef alınarak PCR ile taşıyıcılık oranları belirlendi. *vanA* (732 bp), *vanB* (484 bp), *vanC-1* (811 bp) ve *vanC2/3* (439 bp) genlerinin identifikasyonu için multiplex PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler Tablo 8’de verildi.

**Tablo 8:** mPCR’da kullanılan primerlerin oligonükleotid dizilimleri

|                       |                                                                        |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <i>vanA</i>           | A1-5’-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3’<br>A2-5’-GTA CAA TGC GGC AGT TA-3’     |
| <i>vanB</i>           | B1-5’-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3’<br>B2-5’-GAT TTC GTT CCT CGA CC-3’     |
| <i>vanC-1</i>         | C1-5’-GGT ATC AAG GAA ACC TC-3’<br>C2-5’-CTT CCG CCA TCA TAG CT-3’     |
| <i>vanC-2, vanC-3</i> | C3D1-5’-CTC CTA CGA TTC TCT TG-3’<br>C3D2-5’-CGA GCA AGA CCT TTA AG-3’ |
| 16S <i>rRNA</i> G1/L1 | L1-5’-CAA GGC ATC CAC CGT-3’<br>G1-5’-GAA GTC GTA ACA AGG-3’           |
| <i>Esp</i>            | F TTGCTAATGCTAGTCCACGACC<br>R GCGTCAACACTTGCATTGCCGA                   |

DNA ekstraksiyonu;

İzole ve identifiye edilen enterokok türlerinin genomik DNA ekstraksiyonu manuel ve prensibi spin kolon sistemine dayalı DNA Extraction With Genolyse kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla izolatların TSA’daki bir gecelik taze kültürlerinden seçilen bir öze dolusu koloni 1 ml’lik nükleaz-free steril su içerisine alındı. 10.000 g’de 15 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonrası üstteki

sıvı uzaklaştırıldı. Kalan ve çökmüş bakteriler üzerine 100 µl lysis buffer konuldu. Tüpler vortekslendi. Tüpler benmaride, 100°C'de 5 dakika boyunca kaynatıldı. Daha sonra tüplerin kapakları açılmadan 15 saniye kısa santrifüj yapıldı. Tüplere 100 µl neutralization buffer eklendi ve vorteks işlemi gerçekleştirildi. 14000 g 5 dakika santrifüj yapıldı. Bu işlemten sonra ayrılan üst sıvı (süpernatant) templeyt DNA olarak PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

PCR amplifikasyonu için 50µl final solusyonu olacak şekilde, 50 ng templeyt DNA, 10 pmol primer, 200 µM dNTP (promega), 1.25 U Taq DNA polymerase (Qiagen), 3µl 10X PCR buffer (Qiagen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve %5 gliserol karışımı Qigen otomotize cihazında hazırlandı.

DNA ekstraktları;

- 1) 94°C'de 120 saniye
- 2) 94°C'de 30 saniye
- 3) 55°C'de 60 saniye
- 4) 72°C'de 60 saniye
- 5) 72°C'de 420 saniye

Toplam 35 siklusk amplifikasyondan sonra izole edilen gen boyutları;

16S rRNA için 320 bp, *esp* için 932 bp, *vanA* için 732 bp, *vanB* için 484 bp, *vanC-1* için 811 bp ve *vanC2/3* için 439 bp olarak elde edilmesi hedeflendi.

Elde edilen DNA örneklerinde PCR ile polimorfik bölgelerin amplifikasyonunu takiben ampliconlar MspI restriksiyon enzimiyle muamele edilerek kesildi. Daha sonra elde edilen bantlar %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV görüntüleme cihazında sonuçlar görüntülendi. Elde edilen amplicon boyutları *vanA* 231bp, 184 bp, 163 bp, 131/133 bp; *vanB* 188/189 bp, 160 bp, 136 bp; *vanC1* 230/237 bp; *vanC2/3* 338 bp, 91 bp olarak tespit edilmesi hedeflendi.

16S rRNA identifikasyonu;

Kariyama ve ark., (2000), Fortina ve ark., (2004) bildirdikleri yöntemle göre enterokokların moleküler identifikasyonu 16S rRNA gen sekansının tam uzunluğu dikkate alınarak türetilmiş polymerase zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlendi.

PCR amplifikasyonu için 30µl final solüsyon olacak şekilde, 50 ng templeyt DNA, 6 pmol primer, 100 µM dNTP (Invitrogen), 2U Hotstart Taq DNA polymerase (Qiagen), 3 µl 10X PCR Buffer (Qiagen) ve 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, karışımı hazırlandı.

PCR şartları;

- 1) 94<sup>0</sup>C'de 120 saniye
- 2) 94<sup>0</sup>C'de 30 saniye
- 3) 55<sup>0</sup>C'de 60 saniye
- 4) 72<sup>0</sup>C'de 60 saniye
- 5) 72<sup>0</sup>C'de 420 saniye

Toplam 35 siklus olmak üzere amplifikasyon gerçekleştirildi. 5µl'lik PCR ürünleri TBE (Tris-HCL, Borik asit, EDTA) bufferda, ethidium bromide (0,5 µg/ml) içeren %1,5'luk agarose jel elektroforez işlemine 100V 2 saat olacak şekilde tabi tutuldu. Bantlar syngene görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Enterokokal yüzey adhezyon molekülü geninin (*esp*) tespiti;

Bu amaçla, Sedgley ve ark. (2005) bildirdikleri yöntem kullanıldı. 30 µl PCR karışımı içerisinde 50 ng templeyt DNA, 6 pmol primer, 100 µM Dntp (İnvitrogen), 2U Hotstart Taq DNA polymerase (Qiagen), 3µl 10X PCR buffer (Qiagen) ve 4µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> olacak şekilde hazırlandı.

PCR şartları;

- 1) 94<sup>0</sup>C'de 120 saniye
- 2) 94<sup>0</sup>C'de 30 saniye
- 3) 55<sup>0</sup>C'de 60 saniye
- 4) 72<sup>0</sup>C'de 60 saniye
- 5) 72<sup>0</sup>C'de 420 saniye

Toplam 35 siklus olmak üzere amplifikasyon gerçekleştirildi. 5µl'lik PCR ürünleri TBE (Tris-HCL, Borik asit, EDTA) bufferda, ethidium bromide (0,5 µg/ml) içeren %1,5'luk agarose jel elektroforez işlemine 100V 2 saat olacak şekilde tabi tutuldu. Bantlar syngene görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Multiplex PCR-RFLP yöntemiyle *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* genlerinin identifikasyonu;

İzole ve identifiye edilen enterokok türlerinin vankomisin direnç genleri Patel ve ark. (1997), Torres ve ark., (2006) bildirdikleri yönteme göre araştırıldı. PCR amplifikasyonları 50µl final solusyonu olacak şekilde ayarlandı. PCR karışımı, 50 ng templeyt DNA, her bir oligonükleotid primerinden 10 pmol, her biri için 200 µM dNTP, 1.25U Taq DNA polymerase, 50 mM KCl, 10 pmol Tris-HCL(ph 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve %5 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

PCR şartları;

- 1) 94<sup>0</sup>C'de 120 saniye
- 2) 94<sup>0</sup>C'de 30 saniye
- 3) 55<sup>0</sup>C'de 60 saniye
- 4) 72<sup>0</sup>C'de 60 saniye
- 5) 72<sup>0</sup>C'de 420 saniye

Toplam 35 siklus olacak şekilde amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

RFLP yöntemi için, 1µl MspI (10U/ml) ve 5 µl 10X restriksiyon enzim buffer (Promega)'dan olmak üzere her bir PCR tüpüne eklendi. Tüpler 13.200 g 20 saniye tutulduktan sonra karışım 37<sup>0</sup>C'de bir gece inkubasyona bırakıldı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %3'lük agaroz jel elektroforezinde 100V 2 saat tutuldu. Sonrasında syngene görüntüleme cihazı ile görüntüleme yapıldı.

Antibiyotik duyarlılık testi;

İzole ve identifiye edilen tavuk ve martı orjinli enterokok suşlarının farklı anatibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik durumları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011) tarafından önerilen disk difüzyon metoduna göre yapıldı.

Bu amaçla standart antibiyotik disklerle duyarlılığı belirlenecek bakteri kültürlerinden birkaç koloni alınarak BHI broth tüplerine ekildi. Tüpler 5-6 saat 37<sup>0</sup>C'de inkubasyona bırakıldı. İnkusyonu takiben kültürlerin bulanıklığı, McFarland 0,5 standart bulanıklığına ayarlandı.

Bulanıklığı ayarlana kültürlerden steril sıvıplar yardımıyla MHA besiyerinin tüm yüzeyine ekim yapıldı. Standart antibiyotik diskleri 120x120 mm'lik pleytlere

dispenser yardımıyla yerleştirildi ve besiyeriyle teması sağlandı. Pleytler 37<sup>0</sup>C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyondan sonra disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçüldü ve zon çapları çizelge değerleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi (CLSI, 2011).

#### **3.2.4. İstatistiksel analiz**

Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole ve identifiye edilen enterokok türlerinin izolasyon oranları ve antibiyotiklere direnç durumlarının karşılaştırılması için Z-testi kullanıldı (Zar, 1999).

#### 4. BULGULAR

Van ili ve çevresinde gerçekleştirilen bu çalışmada, tavuklardan 500 ve martılardan 500 olmak üzere toplam 1000 dışkı örneği enterokok türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla toplandı. Tavuk ve martı dışkı örnekleri seçilirken bu iki hayvan türünün temasının gözlemlendiği bölgeler tercih edildi (Tablo 5). Örnekler, Haziran-Eylül 2013 tarihleri arası dört aylık bir sürede sağlandı.

##### 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Sonuçları

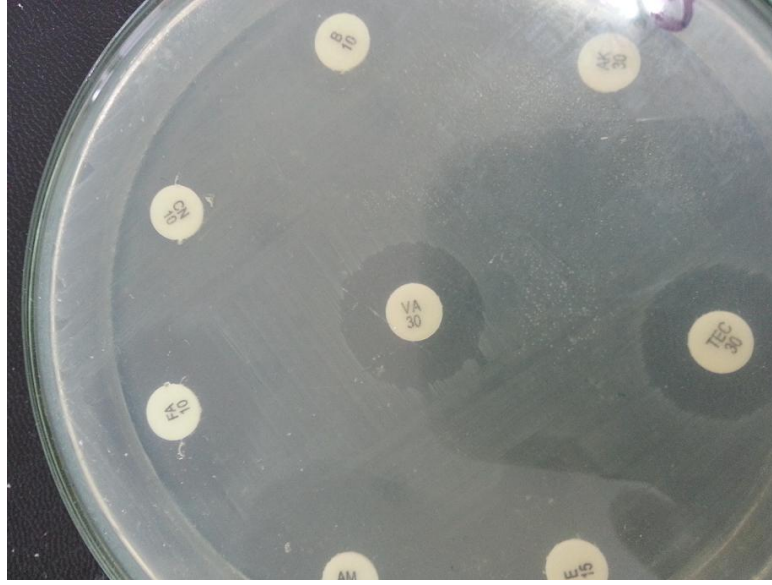
Araştırmada tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole ve identifiye edilen enterokok türlerinin dağılımı ve izolasyon oranlarının karşılaştırılmalı sonuçları Tablo 9’da sunuldu.

**Tablo 9:** Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen enterokok türleri (%)

| Enterokok türü                               | Tavuk             | Martı             | <i>p</i> |
|----------------------------------------------|-------------------|-------------------|----------|
|                                              | İzolat sayısı (%) | İzolat sayısı (%) |          |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                 | 41 (21,3)         | 78 (65,5)         | 0,001    |
| <i>Enterococcus faecium</i>                  | 110 (57,2)        | 21 (17,6)         | 0,001    |
| <i>Enterococcus hirae</i>                    | 27 (14)           | 10 (8,4)          | 0,113    |
| <i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> | 9 (4,6)           | 7 (5,8)           | 0,651    |
| <i>Enterococcus raffinosus</i>               | -                 | 2 (1,6)           | 0,154    |
| <i>Enterococcus durans</i>                   | 5 (2,6)           | 1 (0,8)           | 0,215    |
| Toplam izolat sayısı                         | 192 (38,4)        | 119 (23,8)        | 0,001    |
| Toplam örnek sayısı                          | 500               | 500               |          |

#### 4.2. Antibiyogram Testi Sonuçları

İzolatların antibiyotik direnç/duyarlılıklarının değerlendirmesi oluşan zonun çapının ölçülmesiyle gerçekleştirildi (Şekil 10). Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen enterokok türlerinin 32 farklı antibiyotiğe direnç/duyarlılık sonuçları Tablo 10'da verildi.



**Şekil 10:** Örnek enterokok izolatının antibiyogram testi sonucu

**Tablo 10:** Tavuk ve martı orijinli enterokok izolatlarının antibiyogram sonuçları

| Antibiyotik | Tavuk (n=192) |            |            | Martı (n=119) |           |            | Toplam (n=311) |     |     |
|-------------|---------------|------------|------------|---------------|-----------|------------|----------------|-----|-----|
|             | R (%)         | I (%)      | S (%)      | R (%)         | I (%)     | S (%)      | R              | I   | S   |
| VA          | 1 (0,5)       | 7 (3,5)    | 184 (96)   | 8 (6,7)       | 4 (3,3)   | 107 (90)   | 9              | 11  | 291 |
| TEC         | 1 (0,5)       | -          | 191 (99,5) | 8 (6,7)       | -         | 111 (93,3) | 9              | -   | 301 |
| LEV         | 119 (62)      | 19 (9,9)   | 54 (28,1)  | 27 (22,7)     | 22 (18,5) | 70 (58,8)  | 146            | 41  | 124 |
| PRL         | 93 (48,4)     | -          | 99 (51,6)  | 22 (18,5)     | -         | 97 (81,5)  | 115            | -   | 196 |
| C           | 78 (41,6)     | 48 (25)    | 66 (33,4)  | 38 (32)       | 38 (32)   | 43 (36)    | 116            | 86  | 109 |
| MEM         | 145 (75,6)    | 25 (13)    | 22 (11,4)  | 52 (43,7)     | 20 (16,8) | 47 (39,5)  | 197            | 45  | 69  |
| IPM         | 4 (2,1)       | 7 (3,6)    | 181 (94,3) | 1 (0,8)       | 1 (0,8)   | 117 (98,4) | 5              | 8   | 298 |
| K           | 185 (96,3)    | 4 (2,1)    | 3 (1,6)    | 107 (90)      | 7 (5,8)   | 5 (4,2)    | 292            | 11  | 8   |
| P           | 107 (55,7)    | -          | 85 (44,3)  | 19 (16)       | -         | 100 (84)   | 126            |     | 185 |
| OX          | 188 (97,9)    | -          | 4 (2,1)    | 115 (96,7)    | 1 (0,8)   | 3 (2,5)    | 303            | 1   | 7   |
| CZ          | 189 (98,4)    | -          | 3 (1,6)    | 92 (77,3)     | 15 (12,6) | 12 (10,1)  | 281            | 18  | 104 |
| CXM         | 186 (95,9)    | 2 (1)      | 6 (3,1)    | 88 (74)       | 21 (17,6) | 10 (8,4)   | 274            | 23  | 16  |
| CFR         | 191 (99,5)    | 1 (0,5)    | -          | 118 (99,2)    | -         | 1 (0,8)    | 309            | 1   | 1   |
| FOX         | 139 (72,3)    | 9 (4,7)    | 44 (23)    | 95 (79,9)     | 8 (6,7)   | 16 (13,4)  | 234            | 17  | 60  |
| CEP         | 154 (80,2)    | 37 (19,3)  | 1 (0,5)    | 56 (47)       | 51 (43)   | 12 (10)    | 210            | 88  | 13  |
| CEC         | 69 (35,9)     | 113 (58,8) | 10 (5,3)   | 49 (41,2)     | 51 (42,8) | 19 (16)    | 118            | 164 | 29  |
| FEP         | 177 (92,2)    | 13 (6,8)   | 2 (1)      | 97 (81,5)     | 13 (10,9) | 9 (7,6)    | 274            | 26  | 11  |
| KF          | 184 (95,8)    | 8 (4,2)    | -          | 96 (81)       | 23 (19)   | -          | 280            | 31  | -   |
| TOB         | 180 (93,8)    | 1 (0,5)    | 11 (5,7)   | 105 (88,2)    | 4 (3,4)   | 10 (8,4)   | 285            | 5   | 21  |
| CPD         | 94 (49)       | -          | 98 (51)    | 113 (94,9)    | 2 (1,7)   | 4 (3,4)    | 207            | 2   | 102 |
| CTX         | 164 (85,4)    | 11 (5,7)   | 17 (8,9)   | 86 (72,3)     | 21 (17,6) | 12 (10,1)  | 250            | 32  | 29  |
| CPR         | 77 (40,1)     | 78 (40,6)  | 37 (19,3)  | 40 (33,6)     | 5 (4,2)   | 74 (62,2)  | 117            | 83  | 111 |
| S           | 160 (83,3)    | 27 (14,1)  | 5 (2,6)    | 111 (93,2)    | 2 (1,7)   | 6 (5,1)    | 271            | 29  | 11  |
| SXT         | 155 (80,7)    | 1 (0,5)    | 36 (18,8)  | 78 (65,6)     | 1 (0,8)   | 40 (33,6)  | 233            | 2   | 76  |
| ZOX         | 179 (93,2)    | 9 (4,7)    | 4 (2,1)    | 87 (73,1)     | 17 (14,3) | 15 (12,6)  | 266            | 26  | 19  |
| TE          | 36 (18,8)     | 29 (15,1)  | 127 (66,1) | 75 (63)       | 6 (32)    | 38 (5)     | 111            | 35  | 165 |
| AM          | 63 (32,8)     | -          | 129 (67,2) | 2 (1,6)       | -         | 117 (98,4) | 65             |     | 246 |
| B           | 5 (2,6)       | 17 (8,9)   | 170 (88,5) | 28 (23,5)     | 33 (27,7) | 58 (48,8)  | 33             | 50  | 228 |
| E           | 118 (61,5)    | 26 (13,5)  | 48 (25)    | 52 (43,7)     | 50 (42)   | 17 (14,3)  | 170            | 76  | 65  |
| FA          | 37 (19,3)     | 1 (0,5)    | 154 (80,2) | 19 (16)       | -         | 100 (84)   | 56             | 1   | 254 |
| CN          | 123 (64)      | 41 (21,4)  | 28 (14,6)  | 98 (82,3)     | 12 (10,1) | 9 (7,6)    | 221            | 53  | 37  |
| AK          | 167 (87)      | 2 (1)      | 23 (12)    | 113 (95)      | -         | 6 (5)      | 280            | 2   | 29  |

VA: vankomisin; TEC: teikoplanin; LEV: levofloksasin; PRL: piperasillin; C: kloramfenikol; MEM: meropenem; IPM: imipenem; K: kanamisin; P: penisillin; OX: oksasillin; CZ: sefazolin; CXM:sefuroksim; CFR: sefadroksil; FOX: sefoksitin; CEP: sefoperazon; CEC: sefklor; FEP: sefepim; KF: sefalothin; TOB: tobramisin; CPD: sefpodoksım; CTX: sefotaksim; CPR: sefprozil; S: streptomisin; SXT: trimetoprim/sulfametoksazol; ZOX: seftizoksım; TE: tetrasiklin; AM: ampisilin; B: basitrasin; E: eritromisin; FA: fusidik asid; CN: gentamisin; AK: amikasin.

Tavuk ve martı orijinli *E. faecalis* + *E. faecium*, *E. casseliflavus/gallinarum* + *E. durans* ve *E. hirae* izolatlarının antibiyogram sonuçları karşılaştırmalı olarak sırasıyla Tablo 11, 12 ve 13'te sunuldu.

**Tablo 11.** Tavuk ve martı orijinli *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranlarının karşılaştırılması (%)

| Antibiyotik | Tavuk<br><i>E. faecalis</i><br>(41)<br>R (%) | Martı<br><i>E. faecalis</i><br>(78)<br>R (%) | p<br>0,001 | Tavuk<br><i>E. faecium</i><br>(110)<br>R (%) | Martı<br><i>E. faecium</i><br>(21)<br>R (%) | p<br>0,001 |
|-------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|------------|
| VA          | 1 (2,4)                                      | 5 (6,4)                                      | 0,280      | -                                            | 3 (14,3)                                    | 0,061      |
| TEC         | 1 (2,4)                                      | 5 (6,4)                                      | 0,280      | -                                            | 3 (14,3)                                    | 0,061      |
| LEV         | 16 (39)                                      | 12 (15,4)                                    | 0,006      | 85 (77,3)                                    | 7 (33,3)                                    | 0,001      |
| PRL         | 10 (24,4)                                    | 1 (1,3)                                      | 0,001      | 72 (65,5)                                    | 17 (81)                                     | 0,110      |
| C           | 23 (56,1)                                    | 24 (30,8)                                    | 0,007      | 30 (27,3)                                    | 5 (23,8)                                    | 0,735      |
| MEM         | 16 (39)                                      | 20 (25,5)                                    | 0,141      | 102 (92,7)                                   | 19 (90,5)                                   | 0,743      |
| IPM         | 1 (2,4)                                      | 1 (1,3)                                      | 0,671      | 3 (2,7)                                      | -                                           | 0,079      |
| K           | 40 (97,6)                                    | 72 (92,3)                                    | 0,174      | 105 (95,5)                                   | 19 (90,5)                                   | 0,458      |
| P           | 15 (36,6)                                    | 4 (5,1)                                      | 0,001      | 80 (72,7)                                    | 13 (62)                                     | 0,343      |
| OX          | 41 (100)                                     | 76 (97,4)                                    | 0,967      | 107 (97,3)                                   | 21 (100)                                    | 0,079      |
| CZ          | 41 (100)                                     | 57 (73)                                      | 0,001      | 108 (98,2)                                   | 21 (100)                                    | 0,154      |
| CXM         | 40 (97,6)                                    | 53 (67,9)                                    | 0,001      | 107 (97,3)                                   | 21 (100)                                    | 0,079      |
| CFR         | 41 (100)                                     | 78 (100)                                     | 0,001      | 109 (99,1)                                   | 20 (95,2)                                   | 0,416      |
| FOX         | 29 (70,7)                                    | 76 (97,4)                                    | 0,001      | 74 (67,3)                                    | 8 (38,1)                                    | 0,011      |
| CEP         | 33 (80,5)                                    | 30 (38,5)                                    | 0,001      | 88 (80)                                      | 19 (90,5)                                   | 0,160      |
| CEC         | 12 (29,3)                                    | 27 (34,6)                                    | 0,547      | 33 (30)                                      | 11 (52,4)                                   | 0,057      |
| FEP         | 41 (100)                                     | 62 (79,5)                                    | 0,001      | 105 (95,5)                                   | 20 (95,2)                                   | 0,966      |
| KF          | 39 (95,1)                                    | 53 (67,9)                                    | 0,001      | 105 (95,5)                                   | 20 (95,2)                                   | 0,966      |
| TOB         | 39 (95,1)                                    | 66 (84,6)                                    | 0,134      | 105 (95,5)                                   | 21 (100)                                    | 0,022      |
| CPD         | 39 (95,1)                                    | 74 (94,9)                                    | 0,952      | 39 (35,5)                                    | 21 (100)                                    | 0,001      |
| CTX         | 35 (85,4)                                    | 48 (61,5)                                    | 0,002      | 94 (85,5)                                    | 20 (95,2)                                   | 0,088      |
| CPR         | 9 (22)                                       | 9 (11,5)                                     | 0,160      | 50 (45,5)                                    | 16 (76,2)                                   | 0,003      |
| S           | 38 (92,7)                                    | 73 (93,6)                                    | 0,854      | 88 (80)                                      | 20 (95,2)                                   | 0,011      |
| SXT         | 31 (75,6)                                    | 43 (55,1)                                    | 0,019      | 91 (82,7)                                    | 20 (95,2)                                   | 0,033      |
| ZOX         | 39 (95,1)                                    | 49 (62,8)                                    | 0,001      | 102 (92,7)                                   | 20 (95,2)                                   | 0,633      |
| TE          | 6 (14,6)                                     | 53 (67,9)                                    | 0,001      | 22 (20)                                      | 8 (38,1)                                    | 0,108      |
| AM          | 2 (4,8)                                      | 1 (1,3)                                      | 0,317      | 58 (52,7)                                    | 1 (4,8)                                     | 0,001      |
| B           | 11 (26,8)                                    | 24 (30,8)                                    | 0,650      | -                                            | 11 (52,4)                                   | 0,001      |
| E           | 16 (39)                                      | 24 (30,8)                                    | 0,372      | 91 (82,7)                                    | 20 (95,2)                                   | 0,033      |
| FA          | 15 (35,6)                                    | 6 (7,7)                                      | 0,001      | 17 (15,5)                                    | 5 (23,8)                                    | 0,399      |
| CN          | 37 (90,2)                                    | 68 (87,2)                                    | 0,609      | 58 (52,7)                                    | 15 (71,4)                                   | 0,088      |
| AK          | 40 (97,6)                                    | 76 (97,4)                                    | 0,967      | 88 (80)                                      | 21 (100)                                    | 0,001      |

**Tablo 12.** Tavuk ve martı orijinli *E. casseliflavus/gallinarum* ve *E. durans* izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranlarının karşılaştırılması (%)

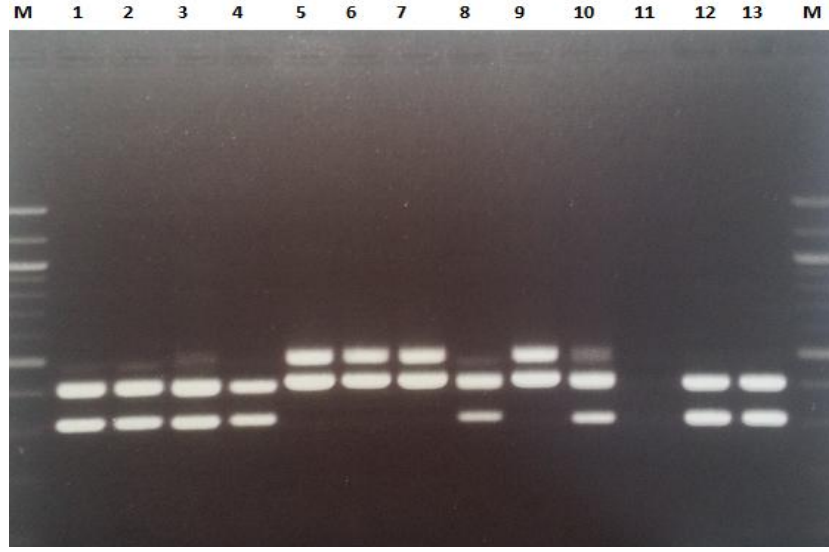
|                    | Tavuk                                                 | Martı                                                 | p            | Tavuk                               | Martı                               | p            |
|--------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|
| <b>Antibiyotik</b> | <b><i>E. casseliflavus/gallinarum</i>(9)<br/>R(%)</b> | <b><i>E. casseliflavus/gallinarum</i>(7)<br/>R(%)</b> | <b>0,651</b> | <b><i>E. durans</i>(5)<br/>R(%)</b> | <b><i>E. durans</i>(1)<br/>R(%)</b> | <b>0,215</b> |
| VA                 | -                                                     | -                                                     | 1            | -                                   | -                                   | 1            |
| TEC                | -                                                     | -                                                     | 1            | -                                   | -                                   | 1            |
| LEV                | 1 (11,1)                                              | 4 (57,1)                                              | 0,032        | 2 (40)                              | 1 (100)                             | 0,006        |
| PRL                | 4 (44,4)                                              | 1 (14,3)                                              | 0,155        | -                                   | 1 (100)                             | 0,167        |
| C                  | 3 (33,3)                                              | 5 (71,4)                                              | 0,101        | 1 (20)                              | 1 (100)                             | 0,333        |
| MEM                | 6 (66,6)                                              | 6 (85,7)                                              | 0,354        | 2 (40)                              | 1 (100)                             | 0,006        |
| IPM                | -                                                     | -                                                     | 1            | -                                   | 1 (100)                             | 0,167        |
| K                  | 9 (100)                                               | 5 (71,4)                                              | 0,094        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| P                  | 6 (66,6)                                              | 1 (14,3)                                              | 0,011        | -                                   | 1 (100)                             | 0,167        |
| OX                 | 9 (100)                                               | 7 (100)                                               | 1            | 5(100)                              | 1 (100)                             | 1            |
| CZ                 | 9 (100)                                               | 6 (85,7)                                              | 0,280        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| CXM                | 9 (100)                                               | 6 (85,7)                                              | 0,280        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| CFR                | 9 (100)                                               | 7 (100)                                               | 1            | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| FOX                | 7 (77,7)                                              | 7 (100)                                               | 0,109        | 3 (60)                              | 1 (100)                             | 0,068        |
| CEP                | 7 (77,7)                                              | 3 (42,9)                                              | 0,134        | 4 (80)                              | 1 (100)                             | 0,264        |
| CEC                | 7 (77,7)                                              | 5 (71,4)                                              | 0,773        | 2 (40)                              | 1 (100)                             | 0,006        |
| FEP                | 9 (100)                                               | 7 (100)                                               | 1            | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| KF                 | 9 (100)                                               | 5 (71,4)                                              | 0,094        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| TOB                | 5 (55,5)                                              | 7 (100)                                               | 0,007        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| CPD                | 4 (44,4)                                              | 7 (100)                                               | 0,001        | 2 (40)                              | 1 (100)                             | 0,006        |
| CTX                | 8 (88,8)                                              | 7 (100)                                               | 0,289        | 4 (80)                              | 1 (100)                             | 0,264        |
| CPR                | 4 (44,4)                                              | 5 (71,4)                                              | 0,257        | 2 (40)                              | 1 (100)                             | 0,006        |
| S                  | 8 (88,8)                                              | 7 (100)                                               | 0,289        | 4 (80)                              | 1 (100)                             | 0,264        |
| SXT                | 7 (77,7)                                              | 5 (71,4)                                              | 0,773        | 4 (80)                              | 1 (100)                             | 0,264        |
| ZOX                | 8 (88,8)                                              | 7 (100)                                               | 0,289        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |
| TE                 | 2 (22,2)                                              | 6 (85,7)                                              | 0,001        | 1 (20)                              | 1 (100)                             | 0,333        |
| AM                 | 2 (22,2)                                              | -                                                     | 0,109        | -                                   | 1 (100)                             | 0,167        |
| B                  | 3 (33,3)                                              | 5 (71,4)                                              | 0,101        | 2 (40)                              | 1 (100)                             | 0,006        |
| E                  | 5 (55,5)                                              | 1 (14,3)                                              | 0,052        | 4 (80)                              | 1 (100)                             | 0,264        |
| FA                 | 1 (11,1)                                              | 4 (57,1)                                              | 0,032        | -                                   | 1 (100)                             | 0,333        |
| CN                 | 5 (55,5)                                              | 5 (71,4)                                              | 0,505        | 3 (60)                              | 1 (100)                             | 0,068        |
| AK                 | 8 (88,8)                                              | 7 (100)                                               | 0,289        | 5 (100)                             | 1 (100)                             | 1            |

**Tablo 13.** Tavuk ve martı orijinli *E. hirae* izolatlarının antibiyotik dirençlilik oranlarının karşılaştırılması (%)

| Antibiyotik | Tavuk                | Martı                | p     |
|-------------|----------------------|----------------------|-------|
|             | <i>E. hirae</i> (27) | <i>E. hirae</i> (10) | 0,113 |
| VA          | -                    | -                    | 1     |
| TEC         | -                    | -                    | 1     |
| LEV         | 11 (40,7)            | 2 (20)               | 0,189 |
| PRL         | 7 (25,9)             | 2 (20)               | 0,697 |
| C           | 12 (44,4)            | 3 (30)               | 0,405 |
| MEM         | 19 (70,4)            | 5 (50)               | 0,260 |
| IPM         | 1 (3,7)              | -                    | 0,308 |
| K           | 26 (96,3)            | 9 (90)               | 0,535 |
| P           | 6 (22,2)             | -                    | 0,005 |
| OX          | 26 (96,3)            | 9 (90)               | 0,535 |
| CZ          | 26 (96,3)            | 6 (60)               | 0,023 |
| CXM         | 25 (92,6)            | 6 (60)               | 0,045 |
| CFR         | 27 (100)             | 10 (100)             | 1     |
| FOX         | 26 (92,6)            | 3 (30)               | 0,001 |
| CEP         | 22 (81,5)            | 3 (30)               | 0,002 |
| CEC         | 15 (55,5)            | 5 (50)               | 0,764 |
| FEP         | 26 (96,3)            | 6 (60)               | 0,023 |
| KF          | 26 (96,3)            | 5 (50)               | 0,004 |
| TOB         | 26 (96,3)            | 9 (90)               | 0,535 |
| CPD         | 10 (37)              | 9 (90)               | 0,001 |
| CTX         | 23 (81,2)            | 9 (90)               | 0,681 |
| CPR         | 12 (44,4)            | 8 (80)               | 0,025 |
| S           | 22 (81,5)            | 9 (90)               | 0,481 |
| SXT         | 22 (81,5)            | 8 (80)               | 0,920 |
| ZOX         | 25 (92,6)            | 9 (90)               | 0,809 |
| TE          | 5 (18,5)             | 7 (70)               | 0,002 |
| AM          | 1 (3,7)              | -                    | 0,308 |
| B           | 2 (7,4)              | 3 (30)               | 0,141 |
| E           | 6 (22,2)             | 6 (60)               | 0,030 |
| FA          | 5 (18,5)             | 2 (20)               | 0,920 |
| CN          | 20 (74)              | 9 (90)               | 0,210 |
| AK          | 19 (70,4)            | 9 (90)               | 0,129 |

#### 4.3. 16S rRNA Analizi Sonuçları

Çalışmada tavuk ve martılardan elde edilen tüm izolatların (311) tür düzeyindeki identifikasyonları 16S rRNA PCR analizi ile yapılarak fenotipik identifikasyon, genotipik olarak doğrulandı (Şekil 11).

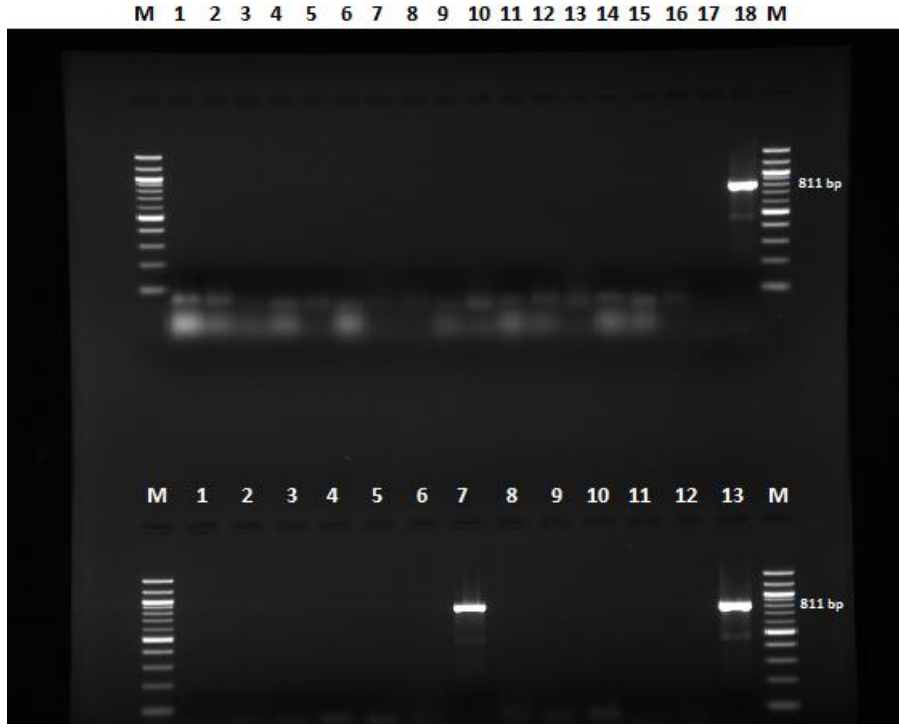


**Şekil 11:** Tavuk orijnli enterokok türlerinin 16S rRNA PCR. M marker (100 bp); *E. faecium* 1, 2, 3, 4, 8 ve 10; *E. hirae* 5, 6, 7 ve 9; negatif kontrol (PCR suyu) 11.

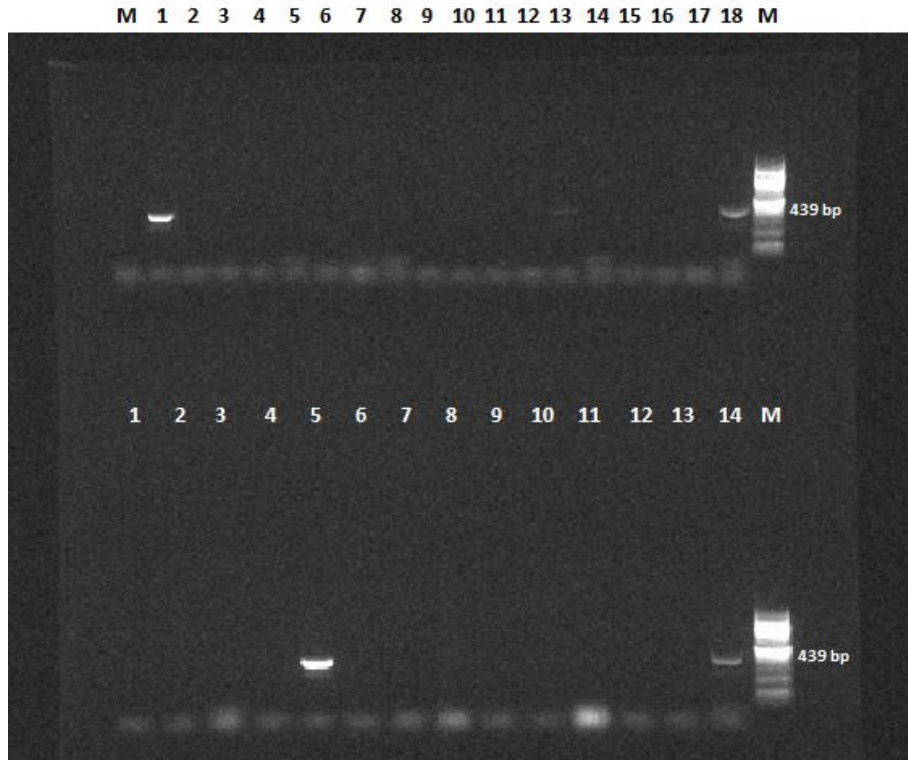
#### 4.4. Van Genlerinin Analiz Sonuçları

Tavuk orijnli 192 enterokok izolatından 8'inin vankomisin dirençlilik (*van*) geni taşıdığı PCR ve multiplex-PCR ile ortaya konuldu. Bunlardan, 1 izolatın *vanA* geni, 2 izolatın *vanC1* geni ve 5 izolatın ise *vanC2/3* geni taşıdığı saptandı. *vanA* geni taşıyan izolatın *E. faecalis*, *vanC1* ve *vanC2/3* geni taşıyan izolatların ise *E. casseliflavus/gallinarium* olduğu belirlendi (Şekil 12 ve 13).

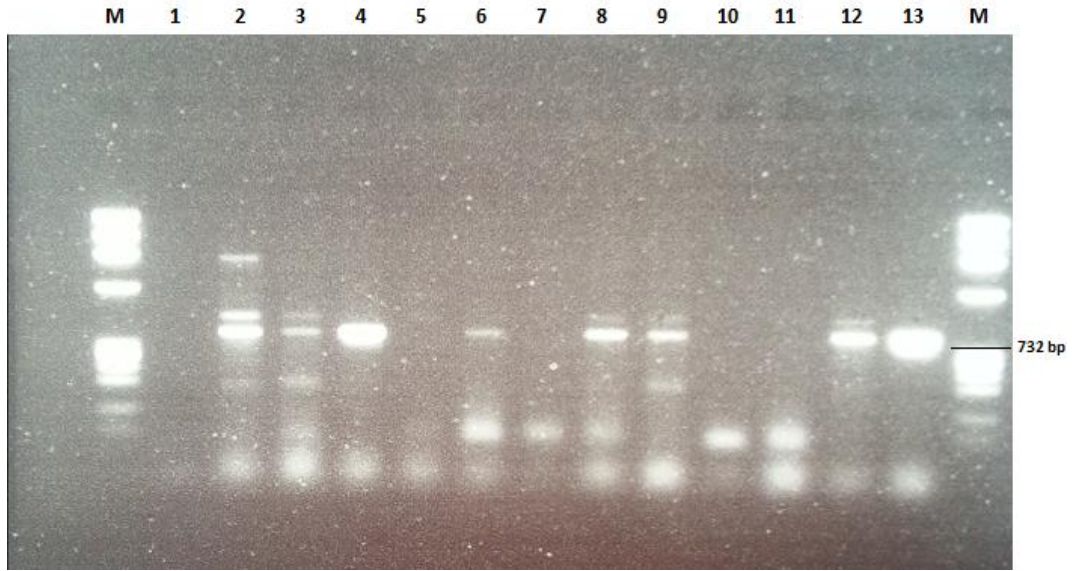
Benzer şekilde, martı dışkı örneklerinden izole edilen 119 enterokoktan 12'sinin *van* geni taşıdığı tespit edildi. Bunlardan 8'inin *vanA* ve 4 izolatın *vanC1* geni taşıdığı belirlendi. *vanA* geni taşıyan 8 izolatın 5'inin *E. faecalis* ve 3'ünün de *E. faecium* olduğu görüldü (Şekil 14). *vanC1* geni taşıyan 4 izolatın tamamı *E. casseliflavus/gallinarium* olarak tanımlandı.



Şekil 12: Tavuk orijinli *vanC1* pozitif *E. casseliflavus/gallinarum* PCR görüntüsü



Şekil 13. Tavuk orijinli *vanC2/3* pozitif *E. casseliflavus/gallinarum* PCR görüntüsü



Şekil 14. Martı orijinli *vanA* pozitif *E. faecalis* ve *E. faecium* PCR görüntüsü

#### 4.5. *Esp* Geni Analiz Sonuçları

Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen 311 enterokok izolatının tamamı *esp* geni açısından negatif olarak bulundu.

#### 4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen enterokok türlerinin yapılan yapılan istatistik analizleri sonucunda *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ve toplam izolat sayısı bakımından türler arası fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 9).

Tavuk dışkı örneklerinden izole edilen toplam enterokok sayısı 192 (38,4) iken martı dışkı örneklerinden izole edilen toplam enterokok sayısı 119 (23,8) olarak belirlendi. Tavuklardan izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatı sayısı 41 (%21,3) iken martılardan izole edilen *Enterococcus faecalis* izolatı sayısı 78 (%65,5) olarak tespit edildi. Tavuklardan izole edilen *Enterococcus faecium* izolatı sayısı 110 (%57,2) iken martılardan izole edilen *Enterococcus faecium* izolatı sayısı 21 (%17,6) olarak belirlendi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enterokoklar, insan ve hayvanlarda sindirim sistemi mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Kötü bakım ve beslenme şartları ve uygunsuz antibiyotik kullanımı enterokok kökenli enfeksiyonların yaygın olarak görülmesinin en önemli nedenidir. Hijyen kurallarının genellikle ihmal edilmesi ve bulaşma şekilleri konusunda yeterli bilgiye sahip olunmaması belkide VRE yaygınlaşmasının daha kolay bir hala getirmektedir. VRE kaynaklı enfeksiyonlara kanatlıların bir arada bulunduğu kümes veya ticari kanatlı işletmelerinde, ahır ve ağıllarda, köpek yetiştirme çiftliklerinde ve hastane ortamlarında sıklıkla rastlanılmaktadır (Moellering, 1982; Krieger ve ark., 1983; Devriese ve ark., 1996). Bu nedenle, VRE enfeksiyonları dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de sık sık gündeme gelmekte ve hala güncelliğini korumaktadır (Ongut ve ark., 2013; Nam ve ark., 2013; Oravcova ve ark., 2013).

Enterokok türlerinin farklı hayvan türlerinde varlığı, yaygınlığı, genetik yapıları, virülens faktörleri ve antibiyotik dirençlilikleri çok sayıda araştırma ile ortaya konulmuştur (Patel ve ark., 1997; Eaton ve Gasson, 2001; Depardieu ve ark., 2004; Oravcova ve ark., 2013). Bu araştırmalarda etkenlerin insan ve hayvanlarda normal floranın bir parçası bazı vakalarda ise enfeksiyonlara katıldıkları vurgulanmıştır.

Birçok antibiyotiğe karşı gerek intrinsik gerekse kazanılmış direnç göstererek sınırlı tedavi seçeneğine sahip olan, özellikle glikopeptid grubu antibiyotiklere mobil genetik elementlerle diğer bakterilere kolaylıkla aktarabilen ve intestinal florada asemptomatik persistent kolonizasyon göstererek endojen kökenli enfeksiyonlara da yol açan enterokok türlerinin, hastane enfeksiyonlarında ki önemi giderek artmaktadır. Avrupa'da 1988, ABD'de de 1989 yılından itibaren bildirilmeye başlanan, daha sonra birçok ülkeden bildirilen, gerek hastane gerek toplum kökenli VRE/GRE suşlarında direncin kaynağı ve mekanizması ile bu suşlarla oluşan enfeksiyonların epidemiyolojik özellikleri ve önlenmesine yönelik farklı ülkelerde

birçok çalışma yapılmıştır (Uttley ve ark., 1988; Leclercq ve ark., 1988; Werner ve ark., 2008; Aktaş ve Derbentli, 2009).

Bu çalışmada köy tipi işletmelerde yetiştirilen tavuklar ve insan popülasyonları ile sıkı ilişki içerisinde olan martılarda çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip enterokok türlerinin fenotipik ve genotipik karakterizasyonu yapıldı. Tavuk ve martılardan izole edilen enterokok türlerinin vankomisin dirençliliği başta olmak üzere çoklu antibiyotik dirençlilikleri arasında benzerlik/farklılık durumlarının yöremizde ilk kez ortaya konuldu. Ayrıca çalışma kapsamında sağlanan izolatların toplum sağlığı bakımından oluşturdıkları risk durumu incelendi.

Quednau ve ark. (1998) Danimarka ve İsveç’de yaptıkları çalışmada tavuk dışkılarında enterokok varlığını araştırmışlardır. Danimarka’daki tavuklarda yapılan izolasyonda 55 izolat (%54), İsveç’teki tavuklarda yapılan izolasyonda 88 (%77) enterokok türü izole etmişlerdir. *E. faecium* Danimarka ve İsveç’de %61 ve %29 oranlarla en yaygın görülen enterokok türleri olmuşlardır. İkinci en yaygın tür ise *E. faecalis* olmuştur. Danimarka ve İsveç’de tavuklardan izole edilen *E. faecalis* izolasyon oranları ise sırasıyla %18 ve %20 şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Enterokok türlerinin ampicillin, kloramfenikol, eritromisin, norfloksasin, penisillin, piperasillin, tetrasiklin, SXT ve vankomisin antibiyotiklerine karşı dirençleri analiz edilmiştir. Danimarka ve İsveç tavuklarından izole edilen enterokok türlerinin sırasıyla %55 ve %73 oranında bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç gösterdikleri rapor edilmiştir. İsveç tavuklarından izole edilen enterokoklarda en yaygın direncin %62 oranla tetrasiklin olduğu bildirilmiştir. Danimarka tavuklarından izole edilen enterokoklarda en yaygın direncin ise %38 oranında eritromisin olduğu tespit edilmiştir. Vankomisin dirençli izolatlar sadece Danimarka’da tespit edilmiştir. *E. faecium* 8 izolat, *E. hirae* 1 izolat ve *E. durans* 1 izolat olarak identifiye edilmiştir. Tavuklardan elde edilen 10 izolatta PCR tekniği kullanılarak *vanA* geni taşıyıcılığı belirlenmişken, *vanB* geni taşıyıcılığına rastlanılmamıştır.

Japonya’da gerçekleştirilen bir araştırmada (Yoshimura ve ark., 1998); tavuklarda glikopeptit dirençli enterokok (GRE) izolasyonu yapılmıştır. Japonya’da çiftliklerden tavuk fekal örnekleri toplanarak GRE oranları tespit edilmiştir. Birincil

olarak fekal örneklerden enterokokların ilk olarak izolasyonu için avoparsin kullanımının yaygın olduğu çiftliklerde bir yıl boyunca takip edilmiştir. Daha sonra Aralık 1995 Kasım 1996 arası 39 broyler çiftliğinden fekal örnek toplanmıştır. Avoparsin kullanımının doğrulandığı 35 broyler çiftliğinden toplanan dışkı örneklerinden 263 adet enterokok izole edilmiştir. Bunlardan 3 çiftlikten toplanan örneklerde 8 adet GRE (%3) izolasyonu yapılmıştır. 8 izolatın 7 tanesi *E. faecalis*, 1 tanesi ise *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. 5 *E. faecalis* izolatının aynı çiftlikte, 2 izolatın ise diğer çiftliklerden olduğu tespit edilmiştir. PCR analizi sonucu GRE izolatlarının tamamının *vanA* geni içerdiği ortaya konulmuştur. Avoparsin kullanılmamış çiftliklerden izole edilen 295 enterokok türünün ise yapılan analizler sonucu glikopeptit direncine sahip olmadığı ortaya konulmuştur.

Haziran 1997 ve Mart 1998 tarihleri arasında bonfile sığır etleri süper marketlerden toplanmıştır. 75 tane sığır etinin 10 tanesinden (%13,3) olmak üzere 19 tane vankomisin dirençli *E. faecium* izole edilmiştir. Ampisillin, kanamisin, basitrasin, gentamisin, streptomisin, eritromisin, kloramfenikol, norfloksasin, nalidiksik asit ve vankomisin antimikrobiyellerine karşı disk difüzyon metoduyla dirençlilikleri ortaya konulmuştur. *E. faecium* izolatları arasında basitrasin, eritromisin ve streptomisine %100 direnç görülmüştür. %32 ampisilin, %42 norfloksasin olmak üzere daha düşük oranda bir direnç görülmüştür. *E. faecium* izolatlarının birçoğunun test edilen antibiyotiklere karşı multiple direnç gösterdiği ortaya konulmuştur (Son ve ark., 1999).

Leme ve ark. (2000) Brezilya'da kanatlı çiftliklerinden izole ettikleri enterokoklarda glikopeptid direncini araştırmışlardır. Enterokokların glikopeptitlere direnci; avoparsinin Brezilya'da büyüme faktörü olarak yemlerde kullanılmaya başlanmasından sonra önem arz etmiştir. Avoparsin, teikoplanin ve vankomisine karşı duyarlılıklar, test ve kontrol gruplarında toplanan kloakal sıvaplardan izole edilen enterokoklarda araştırılmıştır. Test grupları A, B, C grupları olarak 14, 21 ve 35 günlük kanatlılarda karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu kanatlılardan tek bir çiftlik bazlı olarak avoparsin kullanılmıştır. Kontrol grupları (1 ve 2) olarak 25 ve 42 günlük broylerler kullanılmıştır. Glikopeptit dirençli enterokoklar tespit

edilmemiş ancak, avoparsin ile beslenen broylerlerden toplanan örneklerden izole edilen *E. faecium* türlerinde artış tespit edilmiştir. Ayrıca bu durumla tavukların yaşlarının herhangi bir ilgisinin olmadığı ortaya konulmuştur. Avoparsin kullanılan kanatlılarda; 14 günlük tavuk grubunda bulunan 33 tavuktan 38 *Enterococcus spp.*, 21 günlük tavuk grubunda bulunan 30 tavuktan 49 *Enterococcus spp.* ve 35 günlük tavuk grubunda bulunan 37 tavuktan 38 *Enterococcus spp.* izole edilmiştir. Avoparsin kullanılmayan kanatlılardan ise; 25 günlük tavuk grubunda bulunan 35 tavuktan 49 *Enterococcus spp.* ve 42 günlük tavuk grubunda bulunan 30 tavuktan 43 *Enterococcus spp.* izole edilmiştir. Toplamda avoparsin kullanılmış kanatlılarda 125, kullanılmayanlarda 92 enterokok türü izole edilmiştir. *E. casseliflavus* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 11 izolat, 42 günlük tavuklarda 27 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 3 izolat, 21 günlük tavuklarda 1 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 8 izolat olarak belirlenmiştir. *E. dispar* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 1 izolat, 42 günlük tavuklarda 0 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 1 izolat, 21 günlük tavuklarda 0 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 0 izolat olarak belirlenmiştir. *E. durans* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 2 izolat, 42 günlük tavuklarda 1 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 2 izolat, 21 günlük tavuklarda 5 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 0 izolat olarak belirlenmiştir. *E. faecalis* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 23 izolat, 42 günlük tavuklarda 6 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 3 izolat, 21 günlük tavuklarda 5 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 0 izolat olarak belirlenmiştir. *E. faecium* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 5 izolat, 42 günlük tavuklarda 6 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 21 izolat, 21 günlük tavuklarda 27 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 18 izolat olarak belirlenmiştir. *E. gallinarum* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 1 izolat, 42 günlük tavuklarda 8 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 3 izolat, 21 günlük tavuklarda 0 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 6 izolat olarak belirlenmiştir. *E. hirae* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 0 izolat, 42 günlük tavuklarda 1 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 2 izolat, 21 günlük tavuklarda 0 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 3 izolat olarak belirlenmiştir. *E. mundtii* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 0 izolat, 42 günlük tavuklarda 0 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 2

izolat, 21 günlük tavuklarda 0 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 3 izolat olarak belirlenmiştir. *E. raffinosus* avoparsin kullanılmayan 25 günlük tavuklarda 0 izolat, 42 günlük tavuklarda 0 izolat; avoparsin kullanılan 14 günlük tavuklarda 1 izolat, 21 günlük tavuklarda 11 izolat, 35 günlük tavuklarda ise 0 izolat olarak belirlenmiştir.

Lemcke ve Bülte (2000), Almanya’da yapmış oldukları çalışmada; Almanya’dan, Fransa’dan, Hollanda’dan ve Hırvatistan’dan 115 kanatlı ve 50 domuzdan örnek toplamışlar. Toplanan örneklerden 1643 enterokok türü izole etmişlerdir. Almanya’dan kanatlılardan 61 örnek toplanmış ve bunlardan 44 tane (%72,1) VRE izole edilmiş; Fransa’dan kanatlılardan 10 örnek toplanmış ve bunlardan 10 tane (%100) VRE izole edilmiş; Hollanda’dan kanatlılardan 43 örnek toplanmış ve bunlardan 33 tane (%76,7) VRE izole edilmiş ve Hırvatistan’dan kanatlılardan 1 örnek alınmış ve bunlardan 1 tane (%100) VRE izole edilmiştir. Kanatlılardan toplanan 115 örnekten 87 (%75,1) VRE izole edilmiştir. Bu çalışmada yapılan 1643 enterokok türünden 1150 tanesi kanatlılardan izole edilmiş, bunlardan 358 tanesi VRE olarak tespit edilmiş ve 202 tanesinin *vanA* genini taşıdığı (*E. faecium* 127, *E. faecalis* 31, *E. durans* 34, *E. hirae* 10) tespit edilmiştir. *E. gallinarum* suşlarından 1 tanesinin *vanA* + *vanC1* geni, 33 tanesinin ise *vanC1* geni taşıdığı belirlenmiştir. *E. casseliflavus* suşlarından 13 tanesinin *vanC2* geni, 1 tanesinin ise *vanC2* + *vanC3* geni taşıdığı belirlenmiştir. 1 *E. flavescens* suşunda *vanC2* + *vanC3* geni belirlenmiştir.

Aarestrup ve ark. (2000) Danimarkada yaptıkları bir çalışmada 1998 yılının ilk 9 ayında broylerlerden toplanan örneklerde 126 *E. faecalis* ve 122 *E. faecium* izolasyonu yapmışlardır. Her iki türün basitrasin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, kanamisin, penisillin, streptomisin, kuinupristin-dalfopristin, tetrasiklin ve vankomisin duyarlılıklarını araştırmışlardır. *E. faecalis* türlerinde; kloramfenikol %2, basitrasin %60, eritromisin %44, tetrasiklin %59, HL-gentamisin direnci birkaç izolatta, HL-kanamisin %2 ve HL-streptomisin direnci %10 olarak belirlenmiştir. *E. faecium* türlerinde ise; avilamisin %35, vankomisin %10, kloramfenikol çok sınırlı sayıda, eritromisin %74, kuinupristin-dalfopristin %79, virginiamisin %75, tetrasiklin %32, HL-kanamisin %1 ve HL-streptomisin direnci %3 olarak

belirlenmiştir. Tüm *E. faecium* izolatlarının yapılan PCR analizinde *vanA* geni taşıdığı belirlenmiştir.

Danimarka’da yapılan bir araştırmada (Aarestrup ve ark. 2001) broyler kesimhanelerinde 1995-2000 yılları arasında alınan kloakal sıvı örneklerinden 856 *E. faecium* izole edilmiştir. Disk difüzyon testi ile eritromisin, vankomisin, virginiamisin ve avilamisin duyarlılıklarına bakılmıştır. Broylerlerdeki *E. faecium* izolatlarının 1995-2000 yılları arasındaki duyarlılık sonuçları; 1995 yılında (11 izolat) avilamisin %63,6, eritromisin %54,5, vankomisin %72,7, virginiamisin %27,3; 1996 yılında (106 izolat) avilamisin %77,4, eritromisin %64,2, vankomisin %42,5, virginiamisin %58,5; 1997 yılında (207 izolat) avilamisin %65,2, eritromisin %76,3, vankomisin %20,8, virginiamisin %66,2; 1998 yılında (154 izolat) avilamisin %28,6, eritromisin %70,8, vankomisin %8,4, virginiamisin %60,4; 1999 yılında (189 izolat) avilamisin %21,2, eritromisin %27,5, vankomisin %9, virginiamisin %39,2; 2000 yılında ise (189 izolat) avilamisin %4,8, eritromisin %12,7, vankomisin %5,8, virginiamisin %33,9 şeklinde bulunmuştur. Vankomisin direncinin avoparsin yasaklanıktan sonra 5 yıldan fazla yapılan takibinde Danimarka’da broylerlerde varlığını devam ettirdiği belirlenmiştir. Hayvan üretimi sırasında antibiyotiklerin kullanımının VRE prevalansının artmasında önemli olduğu ve bu durumun insan sağlığı için de önemli bir risk oluğu ortaya konulmuştur. Bununla paralel olarak Almanya’da yapılan çalışmalarda insanlarda yapılan GRE (glikopeptid dirençli *E. faecium*) oranlarında 1994 yılında %13 bulunmuş, avoparsin’in 1996 yılında Almanya’da yasaklanmasından sonra 1997 yılında yapılan bir çalışmada bu oranın %4’e düştüğü görülmüştür. Benzer olarak İtalya’da GRE varlığında düşüşler belirlenmiştir. Hollanda’da da 1997-1999 yılları arası yasaklanma sonrası insan, broyler ve domuzlarda GRE oranlarında benzer düşüşler tespit edilmiştir.

Norveç’te yapılan bir çalışmada; avoparsin kullanılmış çiftliklerden broyler ve hindi karkası, avoparsin kullanılmamış çiftliklerden ise kontrol amaçlı yumurtacı tavuk karkası alınmıştır. Her bir örnek için 150 çiftlik seçilmiştir. Çalışmada avoparsin kullanımının yasaklanmasından sonraki 3 yıl içerisinde Norveç’teki kanatlı karkaslarında VanA tip VRE varlığı araştırılmıştır. Eylül 1997 ve Haziran 1998 arası

Norveç’te 2 mezbahanededen 150 farklı çiftlikte olmak üzere 150 kanatlı karkasından olmak üzere örnekler toplanmıştır. Bunların avoparsin kullanılmış 100 hindi ve broyler karkası olacak şekilde örnekleme yapılmış, diğer avoparsin kullanılmamış 50 adet karkas ise yumurtacı tavuklardan toplanmıştır. Kesimhanelerde hergün bir örnek alınacak şekilde örnekleme yapılmıştır. İzole edilen bakterilerin disk difüzyon testi ile ampicillin, kloramfenikole, eritromisine, gentamisine, streptomisin ve tetrasiklin duyarlılıkları analiz edilmiştir. Et örneklerinden (broyler ve hindi 100 örnek) 30 tanesinde VRE tespit edilmiştir. 50 tane yumurtacı tavukta ise hiçbir VRE tespiti yapılmamıştır. Zenginleştirilmiş basamak kullanılarak yapılan çalışmada ise 100 örnekte 81 VRE tespit edilmiş, yumurtacı tavuklardan alınan 50 örnekte ise 9 tane (%18) VRE tespit edilmiştir. Her örnekten sadece 1 izolat elde edilmiş ve toplamda 90 VRE ileri aşamada karakterize edilmiştir. Bunların 87 tanesi *E. faecium*, 2 tanesi *E. mundtii* ve 2 tanesi ise *E. hirae* olarak identifiye edilmiştir. Tüm VRE izolatlarının vankomisin dirençli olduğu ve PCR ile yapılan analizde *vanA* geni taşıdığı ortaya konulmuştur. Tüm izolatların ampicillin ve kloramfenikol duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Yüksek düzeyde aminoglikozid direncine ise sahip olmadıkları tespit edilmiştir. 4 izolatın eritromisine ve 13 izolatın tetrasikline dirençli olduğu bulunmuştur. 1 izolatın vankomisin direncine ek olarak hem eritromisin hem de tetrasikline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Direkt ekim yapılan broyler ve hindi örneklerinden 100 örnekte 30 VRE izolasyonu yapılmış, ancak yumurtacı tavuklardan izolasyon yapılmamıştır. Zenginleştirilmiş besiyeri kullanılan yöntem ile gerçekleştirilen izolasyonda 100 örnekte 80 VRE izolasyonu, kontrol amaçlı kullanılan yumurtacı tavuklarda ise 50 örnekte 9 VRE izolasyonu yapılmıştır. Tüm VRE izolatları vankomisine yüksek dirençli bulunmuş ve *vanA* geni içerdikleri tespit edilmiştir. Norveç’teki kanatlı fekal örnekleri analiz sonuçları ile elde edilen VRE prevalansı, bu çalışma sonuçları ile örtüşmektedir. Bu çalışmada broyler ve hindi karkaslarında VRE’nin yüksek prevalansı ortaya konulmuştur. Sonuç olarak, tüketicilerin raflarda satılan kanatlı etleri ile kurdukları direkt temas sonucu VRE’ye maruz kalabileceklerinin önemi vurgulanmaktadır (Borgen ve ark., 2001).

Malezya’da yapılan bir çalışmada; kanatlı çiftliklerinden enterokok türleri izole edilmiştir. Bu izolatlarda *vanA* ve *vanC2/3* genleri taşıyıcılığını analizi

yapılmıştır. Kanatlılardan izole edilen enterokok türlerinin (RAPD-PCR), antibiyotik dirençlilikleri, plazmid içeriği, van genleri varlığı ve bunlar arasındaki korelasyon analiz edilmiştir. Tüm izolatlarda çoğul dirençlilik olduğu görülmüştür. Kloramfenikol (37/70), takiben ampisilin (15/70) ile en etkili ilaçlar olarak tespit edilmiştir. Diğer antibiyotiklerde ise %64,3-%100 arasında direnç geliştiği görülmüştür. Disk difüzyon yöntemi ile belirlenen vankomisin dirençli *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. faecium* izolatlarının tamamının *vanA* geni taşıdığı tespit edilmiştir. *E. casseliflavus* izolatlarının ise tamamının *vanC2/3* geni taşıdığı belirlenmiştir. Enterokok türlerinin tamamının *vanB* ve *vanC1* geni taşımadığı tespit edilmiştir. Tüm türlerin genetik yakınlığı ise RAPD-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Toplanan 160 örnekten 35 tanesinde toplam 70 enterokok türü izole edilmiştir. 70 izolatın 41 *E. faecalis*, 18 izolatın *E. durans*, 5 izolatın *E. hirae*, 4 izolatın *E. casseliflavus* ve 2 izolatın *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatların test edilen antimikrobiyel ilaçların çoğuna dirençli olduğu görülmüştür. Enterokok izolatlarına en etkili kullanılacak ilaçların ampisilin (%21,4 direnç oranı) ve kloramfenikol (%52,3 direnç oranı) olduğu görülmüştür. *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında %17 ve %100 arasında değişen oranda ampisilin direnci tespit edilmiştir. Enterokokal enfeksiyonların tedavisinde ampisilin seçilebileceği bu çalışmada ortaya konulmuştur. İzole edilen 5 enterokok türüne karşı kullanılan seftazidin, eritromisin, kanamisin, ve streptomisine karşı direnç olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar insan, broyler ve domuzdan elde edilmiş *E. faecium* ve *E. faecalis* arasında böyle bir direncin görülmesini önemli bulmuşlardır. Ek olarak, enterokok türlerinde gentamisin, nalidiksik asit ve norfloksasine karşı yüksek düzeyde direnç olduğu tespit edilmiştir (Radu ve ark., 2001).

Enterokok türleri arasında sefalosporin,  $\beta$ -laktam, sulfanamidlere karşı intrinsik direnç geliştiği; klindomisin ve aminoglikozide karşı daha düşük oranda intrinsik direnç olduğu görülmektedir. Transposon, konjugatif ve non-konjugatif plazmid temelli dirençte ise kloramfenikol, eritromisine direnç geliştiği; klindamisin, aminoglikozidler, tetrasiklin,  $\beta$ -laktamlar, fluoroquinolon ve glikopeptide yüksek oranda direnç geliştiği rapor edilmektedir. Bu nedenle plazmid taşıyan veya taşımayan VRE etkili gen transfer mekanizmaları ile büyük risk faktörü olarak

değerlendirilirken aynı zamanda virulans faktörlerin kullanabilecek olması nedeniyle de önem arz etmektedir. Radu ve ark. (2001) inceledikleri *E. faecium*, *E. durans* ve *E. hirae* suşlarının tamamında *vanA* genleri açısından pozitiflik saptamışlardır. Ayrıca *E. casseliflavus* izolatlarında *vanC2/3* bulmuşlardır. *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. faecium* izolatlarının ise *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* genlerini taşımadığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar toplumda önemli enfeksiyonlara neden olan enterokok türlerinin ve gıda üretimi yapılan hayvanlardaki VRE taşıyıcılığının aydınlatılması için geniş çapta araştırmalara gerek duyulduğuna dikkat çekmişlerdir (Radu ve ark., 2001).

Hollanda’da (Boogard ve ark., 2002) 2 tavuk popülasyonundan alınan dışkı örneklerinde antibiyotiklere karşı enterokoklarda direncin görülme oranı araştırılmıştır (Antimikrobiyel direnç ürünleri gelişme için veya kanatlılarda tedavi için yoğun olarak kullanılmaktadır). Broylerlerde antibiyotik ve AMPG kullanımı yaygındır. Kanatlı için yer yetiştiriciliği antibiyotik kullanımı biraz daha azdır. Her bir fekal örnekte gentamisin ve vankomisin dirençli enterokoklar daha nadir olarak tespit edilmiştir. Tüm antibiyotiklere direnç görülme oranı yerde yetiştirme yapılan kanatlılardan ise broylerlerde daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Broyler yetiştiriciliği yapılan yerlerde fekal enterokokların dirençli görülme oranı kanatlı kasapları ve yer yetiştiriciliği yapılan çiftliklere oranla antibiyotiklere direnç konusunda daha dirençli oldukları tespit edilmiştir. Broyler tavuklarda direnç ile broyler yetiştiricileri ve kasaplardan izole edilen enterokok oranının doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir. Diğer popülasyonlarda tespit edilen direnç ile yer yetiştiriciliği yapılan yerlerde ise böyle bir doğru orantının olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada 27 izolatın yüksek oranda gentamisin direnci gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatların 2 tanesinin *E. faecium* olduğu belirlenmiş ve vankomisin hariç tüm test edilen antibiyotiklere dirençli oldukları görülmüştür. 5 farklı popülasyonda, 4 farklı türde olmak üzere toplam 73 vankomisin dirençli enterokok tespit edilmiştir. Bunların blot hibridizasyon yöntemi ile *vanA* direnç genini taşıdıkları ortaya konulmuştur. Direncin hayvanlardan insanlara transfer edilebildiği bu çalışmada ortaya konulmuştur. Hollanda’da yapılan bu çalışmanın amacı kanatlılarda, kanatlı yetiştiricilerinde ve kanatlı kasaplarında fekal enterokokal direnç üzerine veteriner

ilaçları ve AMGPS etkileri araştırmak olmuştur. Ek olarak birçok antibiyotiğe direncin belirlenmesi amaç edinilmiştir. 2 farklı kanatlı grubunda çalışma yapılmış, broylerler 8 hafta içerisinde kesime giden genç kanatlılar ve insan tüketimi için yumurtacı tavuklar tercih edilmiştir. Broylerler AMGPS ile beslenerek yetiştirilmiş, yumurtacı tavuklar ise herhangi bir antibiyotiğe maruz bırakılmamıştır. Broylerlere aynı zamanda yüksek oranda veteriner ilaçları da verilmiştir. Yumurtacı tavuklarda ise herhangi bir ilaç kullanılmamıştır. Sonuçlar tavuk ve insanlarda izole edilen VRE'nin PFGE yöntemi ile genotiplendirme yapılarakdan aktarımın olup olmadığı ortaya konulmuştur. İnsan ve tavuklardan izole edilen vankomisin direnç faktörleri arasındaki benzerlik *Tn1546* (transpozon) yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmada 40 broyler, 3 yer tavuğu, 19 broyler çiftçisi, 3 yer tavuğu çiftçisi ve 8 kanatlı kasabından olmak üzere toplam 73 VRE izolasyonu yapılmıştır. Broylerden izole edilen 40 izolatin 24'ü *E. faecium*, 2'si *E. faecalis*, 6'sı *E. hirae* ve 8'i *E. durans* olarak; yer tavuğundan izole edilen 3 izolatin 2'si *E. faecium* ve 1'i *E. faecalis* olarak; broyler çiftçilerinden izole edilen 19 izolatin 10'u *E. faecium*, 8'i *E. hirae* ve 1'i *E. durans* olarak; yer tavuğu çiftçilerinden izole edilen 3 izolatin 2'si *E. faecium* ve 1'i *E. durans* olarak; kanatlı kasaplarından izole edilen 8 izolatin ise 4'ü *E. faecium*, 2'si *E. faecalis* ve 2'si *E. hirae* olarak tanımlanmıştır.

Kolář ve ark. (2002) Çek Cumhuriyeti'nde yapmış oldukları çalışmada; 1999-2000 yılları arasında toplanan fekal örneklerde enterokok varlığı analiz edilmiştir. Toplamda 228 enterokok izolasyonu yapılmıştır. Yapılan duyarlılık testlerinde %80 tetrasiklin, %59 eritromisin ve %34 nitrofurantoin dirençli olduğu belirlenmiştir. Yüksek düzey streptomisin direnç oranının %22 olduğu belirlenmiştir. 11 enterokok izolatinın vankomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. 6 tanesinin *vanA* pozitif *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir. 3 suşun *vanB* pozitif enterokok türleri olduğu, 2 suşun birinin *vanB* pozitif *E. faecium* ve diğer bir suşun ise *vanB* pozitif *E. faecalis* olduğu tanımlanmıştır.

2003 yılında yapılan bir çalışmada; Mart 2001 Haziran 2002 arası 263 adet marketten perakende çiğ etler (tavuk, hindi, domuz, sığır) toplanıp enterokok türleri yönünden incelenmiştir. 1357 enterokok bu örneklerden izole edilmiştir. Domuz etlerinin %97'si ve sığır etlerinin %100'ünden enterokok izole edilmiştir. *E. faecium*

%61 oranında en çok izole edilen tür olmuşken, *E. faecalis* %29, *E. hirae* %5,7 olarak izole edilmiştir. Tavuk göğüs etlerinden %79 oranında baskın olarak *E. faecium* izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatların birçok antibiyotiğe dirençli oldukları görülmüştür. Tavuk etlerinden izole edilen *E. faecium*'larda %18 oranında kuinupristin/dalfopristin direncinin olduğu görülmüştür. Vankomisin ve linezolid direncinin ise olmadığı tespit edilmiştir. Kırmızı etlerde enterokok türlerinin yaygınlığının farklı olduğu ve antimikrobiyel direnç profillerinin farklı geliştiği görülmüştür. Toplum sağlığı için orta derece bir risk oluşturan patojen mikroorganizmaların adres gösterildiği bir yerde gıda üretimi yapılan hayvanların florasının insanları etkilemesi önemlidir (Hayes ve ark., 2003).

Mac ve ark. (2003) Almanya'da yaptıkları çalışmada; enterokoklarda vankomisin direnç genlerinin belirlenmesi ve türlerinin farklılıklarını ortaya koymada mPCR kullanmışlardır. Toplanan örneklerden 397 adet enterokok suşu izole edimiş ve mPCR yöntemiyle *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* gen taşıyıcılığını analizi yapılmıştır. 367 enterokokal suş özellikle broyler, sığır ve domuz gibi hayvanlardan izole edilmişlerdir. 2000-2001 arasında Almanya'nın farklı bölgelerinden izolasyon yapılmıştır. Broyler kaynaklı enterokokların identifikasyonunda 3 izolatın *E. avium*, 15 izolatın *E. casseliflavus*, 18 izolatın *E. durans* - *E. hirae*, 50 izolatın *E. faecalis*, 44 izolatın *E. faecium* ve 58 izolatın ise *E. gallinarum* olarak bulunduğu bildirilmiştir. 19 broyler suşunda *vanA* geni taşıyıcılığı tespit edilmiştir. *vanB* geni taşıyıcılığı ise tespit edilmemiştir.

Avilamisin, zinc-basitrasin ve tylosin, Yeni Zelanda broyler üretiminde profilaktik olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Avoparsin 1977-2000 yılları arasında bu bölgede yoğun bir şekilde kullanılmıştır. Bölgede gerçekleştirilen bir araştırmada 213 dışkı örneğinde toplam 382 enterokok izole edilmiştir. 382 izolatın %5,8'i vankomisine ve %64,7'si de eritromisine dirençli bulunmuştur. 22 vankomisin dirençli izolatın 18'i (%81,8) *E. faecalis*, 3'ü *E. faecium* ve 1 tanesi de *E. durans* olarak identifiye edilmiştir. Yeni Zelanda'da baskın vankomisin dirençli *E. faecalis* izolatının elde edilmesi avoparsin ile ilgili çalışmaların yapılmasının önemi ortaya koymuştur. Çalışma için Şubat 2002 – Şubat 2003 tarihleri arasında olacak

şekilde toplam 147 çiftlikten broyler dışkı örnekleri toplanmıştır. Vankomisin, eritromisin, gentamisin, ampisilin, basitrasin ve avilamisin dirençliliklerine bakılmıştır. Toplam 382 enterokok izolasyonu yapılmış, 152 izolat (%40) *E. faecalis*, 181 izolat (%47) *E. faecium* ve 49 izolat (%13) diğer enterokok türleri olarak tanımlanmıştır. 382 izolatın 22 tanesinin (%5,8) vankomisin dirençli, 247 tanesinin (%64,7) eritromisin dirençli, 377 tanesinin (%98,7) basitrasin dirençli olduğu, 57 tanesinin ise (%14,9) avilamisin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte gentamisin ve ampisiline direnç belirlenmemiştir. Tüm vankomisin dirençli izolatların *vanA* geni taşıdığı tespit edilmiştir. Vankomisin dirençli 22 izolatın 18 tanesi (%81,8) *E. faecalis*, 3 tanesi (%13,6) *E. faecium* ve 1 (%4,5) izolatın ise *E. durans* olduğu belirtilmiştir (Manson ve ark., 2004).

Hayes ve ark. (2004), 1998 yılının yaz aylarında (11 hafta) İngiltere'nin doğusunda 55 piliç ve 55 broyler olmak üzere toplam 110 çiftlikten dışkı örneği toplamışlardır. 82 çiftlikten toplanan yüzey atıkları ve sıvay örneklerinden 541 adet enterokok suşu izole etmişlerdir. Tüm örnekler tür düzeyinde tanımlanmış ve antimikrobiyal profilleri değerlendirilmiştir. Yapılan identifikasyonda %53,2 *E. faecalis*, %31,4 *E. faecium*, %6 *E. gallinarum*, %3,9 *E. hirae*, %1,5 *E. durans*, %1,2 *E. casseliflavus* ve %0,3 *E. avium* tanımlanmıştır. Araştırmacılar izolatlarda duyarlılık azalmasının en fazla (%98,5) linkozamide olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte streptogramin (%78,3), tetrasiklin (%68), makrolidler (%54,3) ve penisiline (%26,7) karşı da direnç görülmüştür. 5 ana grup antibiyotiğe karşı aynı anda direnç gösterme durumu araştırılmış, hiçbir suçta böyle bir direnç tespit edilmemiştir. Ancak %52,7 oranında dört ana gruba birden direncin görüldüğü izolatlar bildirilmiştir. İzolatlarda linkozamid-makrolid-streptogramin-tetrasiklin (%36); linkozamid-streptogramin-tetrasiklin (%19); linkozamid-penisilin-streptogramin-tetrasiklin (%11) fenotipinde direnç profilleri saptanmıştır. Streptogramine en çok intrinsik direncin *E. faecalis* izolatlarında görüldüğü rapor edilmiştir. Linkozamid-penisilin-streptogramin-tetrasiklin (%23); linkozamid-streptogramin-tetrasiklin (%14) ve linkozamid-makrolid-penisilin-streptogramin-tetrasiklin (%11) en yaygın görülen multi-resistant direnç şekilleri bulunmuştur. *E. faecalis* izolatlarında geniş bir oranda multi resistant direnç görülürken, 18

*E. faecium*, 8 *E. hirae* ve 6 *E. gallinarum* izolatında multi resistant dirence sahip oldukları bildirilmiştir. Vankomisin dirençli *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarına rastlanılmamıştır. Yüksek aminoglikozid direnci 1 *E. avium* izolatı hariç tüm türlerde görülmüştür. Direncin görülme sıklığı %68 *E. faecium*, grup III enterokok türlerinde %67, *E. faecalis* %53,7, *E. casseliflavus* %50, *E. durans* ve *E. gallinarum* %40, *E. hirae* %30 ve grup II enterokok türlerinde %20 oranında belirlenmiştir. Streptomisine yüksek direnç *E. hirae* türleri hariç tüm türlerde görülmüştür. Bununla birlikte kanamisin ve koresistant olarak streptomisin-kanamisin direnci görülmüştür. Yüksek oranda gentamisin direnci sadece *E. faecalis* izolatları arasında görülmüştür.

Junco ve ark. (2005) İspanya’da; 5 farklı çiftlikten 100 hayvandan dışkı örnekleri toplamışlar ve enterokokal enfeksiyonlar da yaygın olarak kullanılan antibiyotikler ile kanatlı dışkılarından izole edilen enterokokların arasındaki ilişki ortaya koymuşlardır. Penisilin, ampisilin, vankomisin ve teikoplanin MIC değerleri belirlenmiş ve yüksek aminoglikozid direnci değerlendirilmiştir. Yüksek aminoglikozid direncini doğrulamak amacıyla PCR yöntemi kullanılmıştır. 55 enterokok izolasyonu yapılmış, bunların %63,6’sı *E. faecalis*, %12,7’si *E. mundtii*, %9,1’i *E. faecium*, %7,3’ü *E. casseliflavus*, %3,7’si *E. durans* ve %3,6’sı *E. hirae* olarak tanımlanmıştır. Van, TEC, P ve Am direnç genleri hiçbir izolatta belirlenmemiştir. Kanatlılar arasındaki direnç oranlarının hastaneden izole edilen direnç gen oranları daha az olarak görülmüştür.

Garcia-Migura ve ark. (2005) İngiltere’de; broyler tavuklarından ve domuz çiftliklerinde vankomisin dirençli *E. faecium*’un karakterizasyonu araştırılmıştır. İngiltere’de yapılan bu çalışmada kanatlı ve domuzlardan izole edilen *E. faecium*’ların varlığı ve moleküler epidemiyolojisi ortaya konulmuştur. Bu çalışmada 47 çiftlikten örnekleri toplamışlar, her bir ziyaret edilen çiftlikten 40-60 arası örnek toplamışlardır. Fekal ve çevresel örneklerden toplamda 247 VREF izolasyonu yapılmıştır. PFGE ile VREF başta olmak üzere daha az görülen türler ortaya konulmuştur. Tüm izolatların *vanA* geni taşıdığı, ancak *esp* geni taşımadığı belirlenmiştir. 76 VREF izolatının 9 veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği ve bu direnç fenotipinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Multi resistant’lık ile ilgili

yapılan PFGE analizinde suşlar arasında korelasyon görülmemiştir. %93 penisiline, %89 tetrasikline, %87,5 eritromisine ve %50 kuinupristin/dalfopristin'e direnç olduğu belirlenmiştir.

Khan ve ark. (2005) Amerika Birleşik Devletleri'nde; multi dirençli enterokok izolasyonu yapmışlardır. Mastitisli ineklerin sütünden 2 izolat, tavuk atıklarından 9 izolat ve hindi atıklarından 19 izolat identifiye edilmiştir. 25 izolatın *E. gallinarum* ve 5 izolatın *E. faecalis* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların birçoğunun vankomisin, gentamisin, streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, basitrasin, kanamisin ve nalidiksik asit dirençli olduğu tespit edilmiştir. Siprofloksasin, sulfamethoksazol, kloramfenikol, ampisilin ve ofloksasine duyarlı olduğu görülmüştür. *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* vankomisin direnç genleriyle virulans faktörü olarak biyofilm oluşturan yüzey proteini (*esp*), *clyA* ve *cylB* genleri araştırılması yapılmıştır. Tekli ve multipleks şeklinde yapılan PCR analizleri ile 22 *E. gallinarum* suşunun *vanC1* geni taşıdığı belirlenmiştir. 5 *E. faecalis* ve 3 *E. gallinarum* suşunun ise *van* direnç genlerini taşımadığı tespit edilmiştir. Hiçbir suşun *esp* genini taşımadığı PCR ile ortaya konulmuştur. Bu çalışmada kanatlı atıklarında ve mastitli hayvanlardan elde edilen sütlerde intrinsik dirence sahip VRE moleküler karakterizasyonu, izolasyonu ve biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Aslında VRE'ler, örneğin *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* kazanılmış vankomisin direncini belirleyen genleri taşıması bakımından önemlidir. Ancak nadir olarak insan ve hayvanlarda enfeksiyona sebep olur.

Hershberger ve ark. (2005) Amerika Birleşik Devletleri'nin Michigan, Wisconsin ve Indiana eyaletlerindeki hayvan çiftliklerinden 6 yıllık (1998-2003) periyot içerisinde antimikrobiyellerin kullanımı ile ilgili potansiyel ve antimikrobiyel direncin epidemiyolojik değerlendirmesi ile ilgili çalışma yapmışlardır. Tüm örnekler 13 tavuk, 18 besi sığırları, 18 süt sığırları, 18 domuz ve 8 hindi çiftliğinden olacak şekilde fekal örnekleme yapmışlardır. Bu 13 tavuk çiftliğinden toplam 338 tavuk fekal örneği analiz edilmiştir. Bu fekal örneklerin tamamından 1256 *E. faecium* ve 656 *E. faecalis* izole edilmiştir. Elde edilen izolatların tamamının vankomisin, gentamisin, siprofloksasin ve kuinupristin/dalfopristine karşı duyarlılıkları analiz

edilmiştir. Tavuklardan izole edilen enterokokların %85'inin kuinupristin/dalfopristin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tavuklardan izole edilen *E. faecium* izolatlarında gentamisin direnç oranının %12, *E. faecalis* izolatlarında ise %32 olduğu belirlenmiştir. Tavuklardan izole edilen *E. faecium* izolatlarında siprofloksasin direnç oranının %23, *E. faecalis* izolatlarında ise %64 olduğu belirlenmiştir. Tavuklardan izole edilen *E. faecium* izolatlarının %11'inin kuinupristin/dalfopristin ve gentamisine birlikte direnç gösterdiği belirlenmiştir. Tavuklardan izole edilen *E. faecium* izolatlarının %1,4'ünün gentamisin ve siprofloksasine birlikte direnç gösterdiği belirlenmiştir. Tavuklardan izole edilen *E. faecium* izolatlarının %11'inin kuinupristin/dalfopristin ve siprofloksasine birlikte direnç gösterdiği belirlenmiştir. Tavuklardan izole edilen *E. faecalis* izolatlarının %17'sinin gentamisin ve siprofloksasine birlikte direnç gösterdiği belirlenmiştir. Hiçbir izolatta vankomisin direnci belirlenmemiştir.

De Leener ve ark. (2005) Belçika'da; insan, domuz ve kanatlı *E. faecium* izolatlarının moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. 59 *E. faecium* tespit edilmiş, 19 tanesi insan, 19 tanesi domuz, 4 tane domuz karkası ve 17 tanesi broylerden olmak üzere tespit edilmiştir. 13 insan ve 2 broyler olmak üzere toplam 15 izolatta *vanA* direnç geni tespit edilmiştir.

Poeta ve ark. (2006a) Portekiz'de; 2004 yılının Şubat ve Haziran ayları arasında kanatlı kesimhanelerinden 76 adet kanatlı dışkı örneği toplamışlardır. Vankomisin, teikoplanin, ampisilin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, kuinupristin/dalfopristin ve sipfloksasin disk difüzyon metoduyla duyarlılıkları araştırılmıştır. *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* genleri tüm izolatlarda PCR metoduyla analiz edilmiştir. Kanatlılardan 152 enterokok türü izole edilmiştir. Kanatlılarda en yaygın tür *E. faecalis* olarak belirlenmiştir. *E. faecium* 54 (%35,5), *E. faecalis* 92 (%60,6), *E. hirae* 2 (%1,3) ve *E. durans* 4 (%2,6) olarak tanımlanmıştır. Vankomisin direnci ile ilgili yapılan PCR araştırmasında hiçbir izolatın *van* direnç genlerini taşımadığı rapor edilmiştir. *E. faecium* izolatlarının (54 adet) ilaç duyarlılıkları ampisilin %30, gentamisin %2, streptomisin %0, kanamisin %43, tetrasiklin %94, eritromisin %87, kloramfenikol %7, sipfloksasin %18,5, kuinupristin/dalfopristin %33, vankomisin %0 ve

teikoplanin %0 olarak; *E. faecalis* (92 adet) ampisilin %0, gentamisin %0, streptomisin %3, kanamisin %15, tetrasiklin %98, eritromisin %87, kloramfenikol %20, sipfloksasin %10, vankomisin %0 ve teikoplanin %0 olarak; *E. durans* ve *E. hirae* ise (6 adet) ampisilin %0, gentamisin %0, streptomisin %0, kanamisin %33, tetrasiklin %100, eritromisin %100, kloramfenikol %33, sipfloksasin %0, kuinupristin/dalfopristin %33, vankomisin %0 ve teikoplanin %0 olarak belirlenmiştir.

Kore Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada (Lim ve ark., 2006); 54'ü tavuk dışkılarından ve 31'i de hasta insanlardan olmak üzere 85 enterokok izole edilmiştir. Tavuk dışkılarından izolasyon sonucu elde edilen 54 enterokok suşunun 50'sini *E. faecium*; 2'sini *E. faecalis* ve 2'sini de *E. durans* olarak tanımlamışlardır. Ampisilin, kloramfenikol, eritromisin, fusidik asit, gentamisin, kanamisin, rifampin, spektinomisin, streptomisin, tetrasiklin, teikoplanin, vankomisin olmak üzere antimikrobiyal dirençleri belirlenmiştir. Tüm izolatların en az 4'ten fazla antibiyotiğe dirençli olduğu, yine 1 izolatın (*E. faecalis*) sadece vankomisine dirençli olup bu direnç profilini göstermediği belirlenmiştir. Tavuk dışkı izolatlarında *E. faecium*'ların gentamisin ve kanamisin'e direnç gösterme özelliğini diğer *E. faecalis* (tavuk) ve *E. faecium*'dan (insan) daha düşük olduğu görülmüştür. 2 *E. faecalis* izolatının multi-resistans olduğu belirlenmiştir. 50 adet *E. faecium* izolatının dirençlilik oranları ampisilin 26 (%52), kloramfenikol 3 (%6), eritromisin 43 (%86), gentamisin 0 (%0), kanamisin 1 (%2), streptomisin 50 (%100), tetrasiklin 50 (%100), teikoplanin 50 (%100), vankomisin 50 (%100) şeklinde tespit edilmiştir. 2 adet *E. faecalis* izolatının dirençlilik oranı da ampisilin 0 (%0), kloramfenikol 2 (%100), eritromisin 2 (%100), gentamisin 2 (%100), kanamisin 2 (%100), streptomisin 2 (%100), tetrasiklin 1 (%50), teikoplanin 2 (%100), vankomisin 2 (%100) şeklinde tespit edilmiştir.

Biavasco ve ark. (2007), İtalya'da yaptıkları çalışmada; insan, hayvan ve gıdalarda *vanA* tip enterokokların yaygınlığı, popülasyondaki yapıları, *Tn1546* ve virulans faktörlerini araştırmışlardır. Bu amaçla 69 insan, 49 hayvan ve 36 gıda olmak üzere toplam 154 adet VanA tipi GRE izolasyonu yapmışlardır. İtalya dışından ise 1'i Belçika'dan ve 10 tanesi Norveç'ten olmak üzere 11 tane VanA tipi

GRE'yi izole etmişlerdir. Bunların 5 tanesi insanlardan, 6 tanesi ise hayvanlardan izole edilmiştir. 16S rRNA, VanA geni ve virulans faktörü olarak *esp* geni varlığı araştırılmıştır. 154 GRE'nin 120 tanesinin *E. faecium*, 18 tanesinin *E. durans*, 12 tanesinin *E. faecalis* ve 4 tanesi ise *E. gallinarum* olarak identifiye etmişlerdir. Hayvanlardaki izolatların toplam sayısının 43 olduğu ve 38 tanesinin (1997'de toplanan örnekler) kanatlılardan izole edildiği ve 5 tanesinin domuzlardan izole edildiğini tespit etmişlerdir. Gıdalarda ise kanatlı etlerinden 27, domuz etlerinden 7 ve peynirlerden 2 olmak üzere toplam 36 örnek elde edilmiştir. İnsan intestinal örneklerinden 47 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. faecalis*; hayvan örneklerinden 35 adet *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum*; gıda örneklerinden 24 adet *E. faecium*, 4 adet *E. faecalis*, 6 adet *E. durans*, 2 adet *E. gallinarum*; insan klinik örneklerinden ise 14 adet *E. faecium* ve 7 adet *E. faecalis* izole etmişlerdir. Tüm izolatların multipleks PCR yöntemi ile *vanA*, *vanB* ve *vanC* taşıyıcılığı araştırılmış, tüm izolatların *vanA* geni taşıdığı, 4 *E. gallinarum* izolatının *vanC1* geni taşıdığı tespit edilmiştir. *Esp* geninin PCR ile taranmasında toplamda 5 izolatta *esp* taşıyıcılığı belirlenmiştir. 4 izolatın *E. faecium* olduğu, 1 izolatın *E. gallinarum* olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlarda 1 *E. gallinarum* izolatının kanatlı kökenli olup *esp* geninin pozitif olduğu diğer kanatlı kökenli izolatlarda ise *esp* genini taşımadığı tespit edilmiştir.

Lauderdale ve ark. (2007) Tayvan'da vankomisin analogu olan avoparsinin yasaklanmasından sonra tavuk çiftliklerinde vankomisin dirençli enterokokların oran değişikliğine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 1200 dışkı örneğinden toplam 1021 *E. faecalis* ve 967 *E. faecium* izolatı değerlendirilmiştir. Bunların antimikrobiyel duyarlılık değerlendirmeler tetrasiklin, eritromisin, yüksek oranda aminoglikozidler, siprofloksasin ve kloramfenikol için yapılmıştır. Ayrıca vankomisin direnç genleri değerlendirilmiştir. 2000-2003 yılları arasında VRE oranında *E. faecalis*'te %13,7'den (161/22) %3,7'ye (299/11) gerilemiştir. *E. faecium*'da %3,4'den (119/4), %0'a (300/0) düşüş göstermiştir. VRE oranları 2000 yılında %25 (60/15) iken 2003 yılında ise %8,8'e (80/7) gerilemiş olarak tavuk çiftliklerinde belirlenmiştir. Tüm VRE izolatları yapılan değerlendirmede tetrasiklin ve eritromisine dirençli bulunmuştur. Yapılan değerlendirmede VRE'lerin tamamının

van A taşıdığı ancak teikoplanine duyarlılık gösterdiği, yani *vanB* fenotipi gösterdiği belirlenmiştir. Benzer oranlar her yıl aynı çiftliklerde belirlenmiştir.

Kırıkkale’de yapılan bir çalışmada; mezbahada tavuk boyun derisinden, entansif broyler çiftlikleri ve köylerdeki aile işletmelerindeki tavukların dışkı örneklerinden 132 *E. faecium* ve 67 *E. faecalis* izole etmişlerdir. Entansif yetiştirilen broylerlerde 36 *E. faecium* ve 41 *E. faecalis* tanımlanmıştır. Kırıkkale’deki kırsal kesimde yetiştirilen kanatlılarda 56 *E. faecium* ve 10 *E. faecalis* izolasyonu yapmışlardır. Bunlara ek olarak Ankara’daki kesimhanelerden multipleks PCR yöntemi ile tanımlanmış 40 *E. faecium* ve 16 *E. faecalis* eklenerek çalışma düzenlenmiştir. Bu isolatların başlıca virulans genleri olan *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* ve *hyl* genlerinin multipleks PCR ile tespiti gerçekleştirilmiştir. Enterokok isolatlarının %31,2’sinin en az bir virulans genini taşıdığı tespit edilmiştir. *E. faecium* isolatlarının %1,5 *esp* genini taşıdığı, ancak *E. faecalis* isolatlarının hiçbirinde *esp* geni taşıyıcılığının olmadığını belirlemişlerdir (Doğru ve ark., 2010a).

Doğru ve ark. (2010b) Ankara ve çevresindeki tavuk kesimhanelerinden sağladıkları 106 boyun derisi örneğinin 83’ünden (%78) enterokok izolasyonu yapmışlardır. Enterokok türlerinin *E. faecium* %48 (40/83), *E. durans* %23 (19/83), *E. faecalis* %19 (16/83), *E. gallinarum* %6 (5/83), *E. hirae* %1 (1/83), *E. mundtii* %1 (1/83) ve *E. casseliflavus* %1 (1/83) olarak tanımlanmışlardır. Eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, penisilin-G, streptomisin ve tetrasikline duyarlılıkları disk difüzyon testi ile araştırılmıştır. *E. faecalis* (16) ve *E. faecium* (40) isolatları seçilerek 6 antibiyotik ile ilgili duyarlılık ve dirençlilik durumları değerlendirilmiştir. 56 isolatın tamamına yakını eritromisin (36) ve tetrasikline dirençli çıkmıştır. 40 *E. faecium* isolatından 36 tanesi eritromisine ve 39 tanesi tetrasikline; 16 *E. faecalis* isolatının 15 tanesi eritromisine ve 16 tanesi de tetrasikline dirençli bulunmuştur. 4 *E. faecium* isolatının kloramfenikol, gentamisin ve streptomisine aynı anda dirençli oldukları tespit edilmiştir. Tüm isolatların penisilin-G’ye duyarlı oldukları görülmüştür. Tüm *E. faecalis* isolatlarının streptomisine dirençli olduğu belirlenirken, *E. faecium* isolatlarının %68’i streptomisine dirençli bulunmuştur. *E. faecium* isolatlarının %20’sinin ve *E. faecalis* isolatlarının %31’inin gentamisine

dirençli olduğu belirlenmiştir. Tüm *E. faecium* izolatlarının %25'i eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve streptomisine çoklu direnç göstermiştir. *E. faecalis*'lerde ise çoklu direnç eritromisin, tetrasiklin ve streptomisine %44 oranında bulunmuştur. *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin vankomisine dirençli olmadığı ve PCR ile yapılan *vanA* ve *vanB* gen taşıyıcılığı analizinde hiçbir türün bu genleri taşımadığı rapor edilmiştir.

Dilik ve İstanbulluoğlu adlı araştırmacılar (2010), broyler ve köy tavuklarının bağırsak florasındaki enterokok türlerinin varlığı, yaygınlığı, biyotipleri ve izole edilen suşların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik özellikleri ile plazmid profillerini araştırılmışlardır. Ankara ve Kırıkkale ili çevresinde bulunan ticari broyler işletmeleri ve köy tavukları kümesleri Mayıs 2005 ve Kasım 2005 tarihleri arasında ziyaret edilmiştir. Büyük kapasiteli 4 ticari broyler işletmesinden 400 örnek, kümeslerinin bütünlüğünü temsil edecek şekilde 1-2 metre aralıklarla kümesin her noktasından rastgele tutulan 4-5 haftalık broylerin kloakasından steril sıvap ile alınmıştır. Kapasitesi 10-50 adet arasında değişen 1 köy tavuğu kümesinden 304 örnek ise kümeste bulunan bütün tavukların kloakasından steril sıvap ile alınmıştır. Her iki tip kümeden alınan dışkı örnekleri soğuk zincirde en kısa zamanda laboratuara getirilmiştir. Gram boyama, katalaz testi, safra eskülin testi, PYR testi, %6,5' luk tuzlu ortamda (NaCl) üreme testi uygulanarak enterokok türleri cins düzeyinde adlandırılmıştır. İdentifiye edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları/dirençlilikleri CLSI'nın belirttiği kriterlere göre müeller hinton agar'da disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çeşitli antibiyotiklere dirençli 43 broyler ve 7 köy tavuğu enterokok suşlarının plazmidleri, alkaline lysis yöntemi ile izole edilerek, agar jel elektroforezde plazmid profillerinin tespiti yapılmıştır. 400 broyler örneğinden 229 (%57,25) ve 304 köy tavuğu örneğinden ise 143 adet (%47,03) enterokok suşu izole edilmiştir. Broyler ve köy tavuklarından izole edilen 372 enterokok suşunun tür dağılımları sunulmuştur. Broyler enterokok suşlarının penisiline %5,6, tetrasikline %72, eritromisine %59,3, enrofloksasine %8,7, rifampine %10,9, vankomisine %0,4, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine %6,5 ve %23,1 oranında dirençli oldukları saptanmıştır. Suşların %100'ünün ise linezolid ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Broyler

*E. faecalis* izolatlarının kuinupristin/dalfopristine %90,4 (38/42 adet) dirençli ve %9,5 (4 adet) orta duyarlı, *E. faecium* izolatlarının kuinupristin/dalfopristine %21,6 (21/97 adet) dirençli, diğer enterokok suşlarının ise %20 (18/90 adet) oranında dirençli olduğu saptanmıştır. Broyler enterokok suşlarının tümünün (77/229 adet) %33,6 oranında kuinupristin/dalfopristine dirençli olduğu belirlenmiştir. 229 broyler enterokok suşunun 179'unun (%78,1) tekli veya çoklu antibiyotik dirençli olduğu tespit edilmiştir. Enterokok suşlarının 53'ünün (%23,1) tek, 47'sinin (%20,5) iki, 40'inin (%17,4) üç, 19'unun (%8,2) dört, 11'inin (%4,8) beş ve 9'unun ise (%3,9) altı antibiyotiğe dirençli oldukları belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direnci en fazla *E. faecium*, *E. gallinarum* ve *E. faecalis* türlerinde saptanmıştır. Köy tavuklarından izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline %2, eritromisine %2, enrofloksasine %1,3 oranında dirençli olduğu saptanmıştır. Tüm suşların linezolid, gentamisin, streptomisin, penisilin, vankomisin, teikoplanin ve rifampin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Köy tavukları *E. faecalis* izolatlarının %53,8'inin (7/13) kuinupristin/dalfopristine dirençli, %23'ünün (3/13) orta duyarlı olduğu belirtilmiştir. Diğer enterokok türlerinin kuinupristin/dalfopristine karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Köy tavukları enterokok suşlarının tümünün %4,8 (7/143) oranında kuinupristin/dalfopristine dirençli olduğu tespit edilmiştir. 143 köy tavuğu enterokok suşlarından 15'inin (%10,4) de tek antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır.

Lopez ve ark. (2010) İspanya'da; sağlıklı insan ve kanatlı hayvanlardan topladıkları klinik, gıda ve dışkı örneklerini enterokok türleri açısından incelemiştir. Araştırmacılar klinik örneklerden 18, gıda örneklerinden 15, sağlıklı kanatlı hayvan dışkı örneklerinden 8 ve sağlıklı insan dışkı örneklerinden 10 izolat olmak üzere toplam 51 enterokok izolasyonu yaptıklarını ve bunların 42 *E. faecium*, 2 *E. faecalis*, 4 *E. durans* ve 3 *E. hirae* olarak tanımladıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmada virulans faktör gen analizleri yapılmış, *E. faecium* izolatının 16'sında *esp* pozitif olduğu, 15'inde *hyl*, 13'ünde ise *esp* + *hyl* geni içerdiği PCR ile ortaya konulmuştur.

Çek Cumhuriyeti'nde farklı gıda kaynaklarında enterokok izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen bir araştırmada (Trivedi ve ark., 2011), tür spesifik PCR kullanılarak 127'si *E. faecalis*, 77'si *E. faecium*, 21'i *E. casseliflavus*, 19'u *E. mundtii* ve 6'sı da *E. durans* olmak üzere 250 enterokok izole edilmiştir. 250 izolatın 221 tanesinin (%88,4) bir veya birden fazla virulans faktör genini taşıdığı mPCR ile ortaya konulmuştur. Farklı kanatlı ve kırmızı et örneklerinden izole edilen 75 enterokok türünde *esp* gen oranlarını *E. faecalis* için 4/41 (%10), *E. faecium* 1/25 (%4), *E. casseliflavus* 2/6 (%33), *E. mundtii* 1/2 (%50) ve *E. durans* 1/1 (%100) şeklinde olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir araştırmada (Bayram ve ark. 2011), Şubat-Aralık 2010 tarihleri arasında Mersin ilinde bulunan 20 farklı market ve 20 farklı kasaptan alınan 40 kırmızı et kıyması ve 40 tavuk eti parçası enterokok türleri açısından incelenmiş ve izolatların ampicilin, eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, linezolid, teikoplanin ve vankomisine dirençlilik/duyarlılık özellikleri araştırılmıştır. 40 kırmızı et kıymasının 11'inden (%27,5) enterokok izolasyonu yapılmıştır. 1 örnekte hem *E. faecalis* hem de *E. hirae* ürediği görülmüştür. İzole edilen 12 izolatın 5'i (%42,7) *E. faecalis*, 2'si (%16,7) *E. faecium*, 2'si (26,7) *E. hirae*, diğerleri *E. durans* (%8,3), *E. gallinarum* (%8,3) ve *E. raffinosus* (%8,3) olarak identifiye edilmiştir. İzolatların antimikrobiyal direnç profilleri değerlendirildiğinde 2 izolatın ampicilin ve eritromisine, 1 izolatın sadece ampisiline dirençli olduğu belirlenmiştir. Buna karşın çalışılan diğer antibiyotiklerden kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, linezolid, teikoplanin ve vankomisine karşı direnç tespit edilmemiştir. Çalışmada farklı market ve kasaplardan toplanan 50 tavuk eti parçasının 5'inde (%12,5) enterokok saptanmıştır. Bunların 2'si *E. faecalis*, 1'i *E. faecium* ve 2'si *E. cecunum* olarak isimlendirilmiştir. Tavuk eti parçalarından elde edilen izolatlarda ampicilin, eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, norfloksasin, penisilin, linezolid, teikoplanin ve vankomisine karşı direnç tespit edilmemiştir.

Sırıken ve ark. (2011) Samsun ilinde tüketime sunulan tavuk karkaslarındaki enterokok türlerinin prevalansını ve vankomisin dirençlilik gen faktörlerini

belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 123 adet tavuk karkası analiz etmişlerdir. Bu örneklerden 41'inden (%33,3) izole edilen toplam 92 adet suşu identifiye etmişler, tüm enterokok türlerinin *tuf* genini hedefleyerek PCR ile doğrulama yapmışlardır. Bu izolatların *E. faecalis* veya *E. faecium* olup olmadığını ve vankomisin dirençlilikleri üzerine *ddl* geni ve *van* (*vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* ve *vanG*) genlerinin amplifikasyonuna dayalı multipleks PCR gerçekleştirmişlerdir. Enterokok türlerinin 39'u (%42,4) *E. faecalis* olarak doğrulanırken, hiçbir suş *E. faecium* olarak identifiye edilmemiştir. Geri kalan 53 (57,6) izolat ise *E. faecalis* ve *E. faecium* dışındaki enterokok türleri olarak değerlendirilmiştir. *vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* ve *vanG* genleri belirlenen enterokok türleri içerisinde belirlenmemiştir. Araştırmacılar sonuç olarak tavuk karkaslarında *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının, vankomisin dirençliliği slime faktör oluşturmaları yönünden halk sağlığı için tehlike oluşturmadığı kanaatine varmışlardır.

Tsikrikonis ve ark. (2012) Yunanistan'da, insan ve hayvan izolatlarında biyofilm oluşturma, jelatinaz, hemolizin, *fsrb* ve *esp* virulans genlerinin taşıyıcılığı arasındaki mümkün olan korelasyonu araştırmışlardır. Hastaneye yatırılan hastalardan elde edilen fekal ve klinik örneklerden 219 enterokok izolatı elde edilmiştir. 132 izolat ise hayvan dışkılarından elde edilmiştir. İnsan *E. faecium* izolatlarında *esp* negatiflik ve pozitiflik korelasyonu karşılaştırıldığında sonuçlar önemli olarak değerlendirilmiştir. *Esp* gen taşıyıcılığı sıklığı hayvan *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları ile karşılaştırıldığında insan izolatlarında daha önemli olarak görülmüştür. *E. faecalis*, fekal insan izolatlarının %71,4'ü, buna karşılık insan klinik izolatlarının %52,5'i *esp* pozitif olarak bulunmuştur. *E. faecalis* hayvan izolatları %10,3, insan *E. faecalis* klinik ve fekal örnekleriyle karşılaştırıldığında *esp* taşıyıcılığı daha önemsiz olarak değerlendirilmiştir. *E. faecium* izolatları arasında *esp* gen taşıyıcılığının (insan) klinik izolatlarında %69,2 olduğu görülmüştür. İnsan *E. faecium* fekal örneklerinde ise %38,3 olduğu belirtilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları arasında *esp* taşıyıcılığı oranı açısından bir fark olmadığı görülmüştür (insan klinik ve fekal izolatları, hayvan izolatları). Araştırmacılar, insanlardan izole edilen *E. gallinarum* izolatlarının %25'inde *esp* geni taşıyıcılığı bu

türde ilk kez çalışmalarında tespit edildiğini bildirmişlerdir. *Esp* taşıyıcılığı bakımından hayvanalardan izole edilen 18 *E. gallinarum* izolatında ise *esp* taşıyıcılığı olmadığını rapor etmişlerdir.

İzolatın vankomisine duyarlı olmasına rağmen, genetik olarak, PCR ile *vanA* geni taşıyabileceği belirlenmiştir. İzolatlarda genin var olabileceği ancak nonfonksiyonel olduğu için ifade edilemeyeceği ortaya konulmuştur (Arthur ve Courvalin 1993; Satake ve ark. 1997). *E. casseliflavus* izolatlarının *vanC2/3* geni taşıdığı halde disk difüzyon tekniği ile yapılan antibiyogram testinde vankomisine direnç göstermedikleri rapor edilmiştir (Van Horn ve Rodney 1998).

Devriese ve ark. (1991) bir günlük civcivlerin intestinal florasında *E. faecium* ve *E. faecalis*'i predominant (aynı oranlarda, %41) tür olarak tespit etmişlerdir. 3-4 haftalık tavukların intestinal florasında ise (%46) *E. faecium*'u dominant tür olarak belirlenmiş, aynı zamanda *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. cecorum*, *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türlerini de tanımlamışlardır. 12 haftalıktan büyük tavukların intestinal florasında ise predominant olarak (%50) *E. cecorum* türünü tespit etmişlerdir. Bu çalışmada köy işletmelerindeki tavuklardan yaş dikkate alınmadan dışkı örnekleri alınmış olup *E. faecium* predominant tür olarak bulunmuş ve bunu diğer türler takip etmiştir. Bu sonuçlar enterokokal floradaki türlerin tavukların belirli yaş dönemlerinde değiştiğini ortaya koymaktadır. Öte yanda bu çalışmadaki köy tavukları örneği 12 haftalıktan büyük tavuklardan alınmasına karşın predominant tür olarak *E. faecium* bulunmuştur. *E. cecorum* türü bulunamamıştır. Bunun nedeni *E. cecorum*'un izolasyonunun zor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durumu Devriese ve ark. (1991) grup D antijeninden yoksun olan *E. cecorum*'un, %0,3 sodyum azid içeren besiyerlerinde üreyemedikleri ve CO<sub>2</sub> ile zenginleştirilmiş ortamlarda üreyebildikleri şeklinde açıklamışlardır. Bu araştırmada ise izolasyon için kullanılan besi yeri %0,4 sodyum azid içermekteydi ve CO<sub>2</sub> ile zenginleştirilmiş ortam kullanılmadı.

Yapılan çeşitli çalışmalarda; Japonya'da broyler gaitalarından %44,8 *E. faecium*, %22,8 *E. faecalis*, %12,9 *E. hirae*, %6,7 *E. durans*, %1,1 *E. casseliflavus*, %0,5 *E. gallinarum* türleri (Yoshimura ve ark., 1998), Danimarka

ve İsveç'teki tavuk dışkılarından sırasıyla %29 ve %61 *E. faecium*, %18 ve %20 *E. faecalis*, %9 ve %5 *E. gallinarum*, %2 ve %2 *E. hirae*, %4 ve %0 *E. malodoratus*, %5 ve %0 *E. pseudoavium*, %0 ve %1 *E. raffinosus*, %0 ve %1 *E. avium*, %0 ve %1 *E. dispar* türleri (Quednau ve ark., 1998), Bostwana'da tavuk örneğinden %46,9 *E. faecalis*, %32,9 *E. faecium*, %7,9 *E. casseliflavus*, %7 *E. gallinarum* ve %5,3 *E. avium* türleri (Chingwaru ve ark., 2003), Maryland doğu sahil kıyılarındaki tavuk çiftliklerinden %53,4 *E. faecalis*, %31,4 *E. faecium*, %6 *E. gallinarum*, %3,9 *E. hirae*, %1,5 *E. durans*, %1,2 *E. casseliflavus* ve %0,3 *E. avium* türleri tanımlanmıştır (Hayes ve ark., 2004). Enterokok tür dağılımının farklılık göstermesi, çalışmaların değişik coğrafik bölgelerde yapılmasından ve izolasyon metodlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Junco ve ark. (2005) İspanya'da yaptıkları çalışmada; tavuk dışkılarından *E. faecalis* (%63,6), *E. mundtii* (%12,7), *E. faecium* (%9,1), *E. casseliflavus* (%7,3), *E. durans* (%3,7) ve *E. hirae* (%3,6) türlerini tanımladılar, fakat tavuk orijinli olmasına rağmen *E. gallinarum* ve *E. avium* türlerini tanımlayamadılar. Bunun sebebini izolasyon aşamasında bütün kolonilerin birbirine çok benzemesinden dolayı bazı türlerin varlığının gözden kaçabileceği şeklinde açıklamışlardır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada (Dilik ve İstanbulluoğlu 2010), köy tavuklarına ait dışkı örneklerinden %73,42 *E. faecium*, %10,48 *E. mundtii*, %9,09 *E. faecalis*, %2,09 *E. gallinarum*, %2,0 *E. durans*, %1,39 *E. raffinosus*, %0,69 *E. casseliflavus* ve %0,69 *E. hirae* türleri saptanmıştır. Köy tavuklarında *E. mundtii* türü %10,48, broylerde ise %0,43 oranında bulunmuştur. Köy tavuklarında *E. mundtii* türünün yüksek çıkması, bu türün bitki ve toprak orijinli olmasından ve köy tavuklarının doğal bitkilerle beslenmesinden kaynaklanabilmektedir.

Tıp ve Veteriner Hekimlik alanında antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu oluşan antimikrobiyal direnç dünya çapında önemli bir problem haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnç oranındaki artışlar, sadece patojen bakterilerde değil aynı zamanda kommensal bakterilerde de görülmektedir. Bu kommensal bakteriler, patojen bakteriler için önemli bir direnç gen rezervuarları olmuştur (Lukasova ve

Sustackova, 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Hayvanlarda antibiyotiklerin yaygın kullanımı hayvanların intestinal floralarına dirençli suşların yerleşmesine neden olmaktadır. Hayvansal kökenli çoğul dirençli flora bakterileri insanlara direkt yolla veya hayvansal gıdalar aracılığı ile bulaşabilmektedir. Bu antibiyotik dirençli suşların insanlara bulaşması sonucu meydana gelebilecek enfeksiyonların tedavilerinin güçleşmesine neden olmaktadır. Özellikle vankomisin dirençli enterokoklar halk sağlığında önemli bir global sorun haline gelmiştir (Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000; Van den Bogaard ve ark., 2001; Lukasova ve Sustackova, 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Kaya ve ark. (2007), tavuk intestinal sisteminden izole ettikleri enterokok suşlarının streptomisine %65, tetrasikline %55, eritromisine %45, klindamisine %39, yüksek düzey aminoglikozide %17,5, kloramfenikole %9, siprofloksasine %9 ve penisiline %1,2 oranında dirençli olduklarını rapor etmişlerdir. Çelik (2001) yaptığı çalışmada; enterokok suşlarının (tavuk - köpek orijinli) streptomisine %73, ampisiline %53,8, gentamisine %34,6, tetrasikline %30,7, eritromisine %7,6 oranında dirençli olduğunu bulmuştur. Bu çalışmada ise köy tavuk işletmelerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline %19 dirençli ve %15,1 orta dirençli, eritromisine %61,5 dirençli ve %13,5 orta dirençli ve penisiline %55,7 oranında dirençli oldukları tespit edildi. Tetrasiklin, makrolid, aminoglikozid ve  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin geniş spektrumlu olması, büyümeyi hızlandırma (tiylosin, oksitetrasiklin) veya tedavi amaçlı uzun yıllar kullanılması sonucu antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmuştur. Enterokok suşlarının aynı antibiyotiklere karşı direnç oranlarının çiftliklere göre farklılık göstermesinin bu antibiyotiklerin yoğun veya az kullanımından kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Martin ve ark., 2005; Van den Bogaard ve ark., 2002; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Şili'deki ticari tavuk işletmelerindeki dışkılarından izole edilen enterokokların tetrasikline %81,2, eritromisine %64,5, streptomisine %22,9, penisiline %17,7 ve gentamisine %5,2 oranında dirençli (Martin ve ark, 2005), Portekiz'de 2004 yılında toplanan tavuk dışkı örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline %97, eritromisine %87,5, siprofloksasine %12,5, ampisiline %10,5, streptomisine %2 ve

gentamisine %1 oranında dirençli (Poeta ve ark., 2006a), Çek Cumhuriyeti'nde tavuk enterokok izolatlarının tetrasikline %80, eritromisine %59, yüksek düzey streptomisine %22 ve yüksek düzey gentamisine %7 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir (Kolář ve Sustakova, 2002). Bu çalışmada köy işletmelerindeki tavuk dışkı örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasiklin ve eritromisin antibiyotiklerine karşı direnç oranlarının diğer ülkelere göre düşük olduğu, penisilin, streptomisin, gentamisin ve ampisilin antibiyotiğine karşı ise direnç oranının yüksek olduğu belirlendi. Köy işletmelerinde enterokokların antibiyotik direnç dağılım oranlarının ülkelere göre farklılık göstermesi, antibiyotik kullanım politikalarının ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir.

Avrupa'da antibiyotiklerin büyük çoğunluğu hayvanlarda büyütme faktörü olarak kullanılmıştır (Wegener ve ark., 1999; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Geçmişten bugüne kadar basitrasın, tilosin, monensin, salinomisin, spiramisin, tetrasiklin, virginiamisin, avilamisin, avoparsin, efrotomisin, olakuindoks ve karbodoks büyütme faktörü olarak kullanılmış antibiyotiklerdir (Başustaoğlu, 2004; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Bu antibiyotiklerin hayvan yemlerinde subterapötik dozlarda yaygın kullanımı sonucu bağırsak florasında bulunan bakterilerin bu antibiyotiklere karşı değişik mekanizmalarla direnç geliştirmeleri ve bu direnç genlerini başka bakterilere aktarabilmeleri sonucu dirençli suşların ortaya çıkması yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır (Shuford ve Patel, 2005; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Danimarka'da avoparsinin kullanımı sonucu aynı gruptan olan vankomisin ve teikoplanine karşı çapraz direnç oluşturmaları, VRE saptanması, direncin transfer edilmesi, VRE'ların seleksiyonuna neden olması ve bu dirençli suşların gıdalar ile insanlara aktarılması gibi nedenlere dayanarak hayvanlarda avoparsin kullanımı 1995 yılında yasaklanmıştır (Emborg ve ark., 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Hayvanlarda büyütme amaçlı kullanılan antibiyotiklerin insan hekimliğinde kullanılan aynı grup antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşturmaları sonucu insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğini korumak ve direnç gelişiminin önüne geçmek amacıyla Avrupa Birliği 1999 yılından itibaren avoparsine ek olarak, virginiamisin, basitrasın, tilosin, spiramisin ve avilamisinin büyütme faktörü olarak

kullanımını yasaklamıştır (Butaye ve ark., 2003; Wegener, 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu; 2010). AB'deki uygulamalara paralel olarak ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 09.07.1999 tarih ve 14428 sayılı yazısı ile 30.06.1999 tarihinden itibaren söz konusu antibiyotiklerden avoparsin, spiramisin, virginiamisin, tilyosin fosfat, karbadoks, olakuintoks ve çink-basitrasinin yem katkı maddesi olarak kullanımı yasaklanmıştır (Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Heuer ve ark. (2002) Danimarka'da yaptıkları çalışmada; avoparsinin yasaklanmasından beş yıl sonra broylerlerden ve broyler kümeslerindeki çevresel örneklerden %74,5 oranında VRE'ler tespit etmişlerdir. Aynı ülkede 1998 yılında yapılan çalışmada (Aarestrup ve ark., 2001), VRE direnç oranının %5'ten az oranda olduğu bildirilmiştir. Brezilya'da Sao Paulo'da 10 yıldır avoparsin kullanılan broyler çiftliğinden toplanan dışkı örneklerinden VRE'ler saptanmamıştır (Leme ve ark., 2000). Buna karşın Brezilya'dan Japonya'ya ihraç edilen tavuklarda VRE'ler tespit edilmiştir (Ike ve ark., 1999). VRE oranlarının farklılık göstermesi izolasyon metodu başta olmak üzere birçok faktöre bağlı kaynaklanabilmektedir (Manson ve ark., 2004).

Yeni Zelanda'da avoparsinin yasaklanmasından iki yıl sonra broyler dışkılarındaki VRE oranının %50'den %5,8'e düştüğü (Manson ve ark., 2004), Tayvan'da, avoparsinin yasaklanmasından sonraki 2000-2003 yılları arasındaki broyler *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarındaki vankomisin direncinin %13,4'ten %3,7 ve %3'ten %0'a düştüğü tespit edilmiştir (Lauderdale ve ark., 2007).

Çelik (2001), tavuk (avoparsin kullanılan işletme) enterokok suşlarının vankomisin direncinin %13,6 oranında olduğunu rapor etmesine rağmen, Kaya ve ark. (2007) inceledikleri tavuklarda vankomisin ve teikoplanin dirençli enterokok suşu tespit edemediklerini rapor etmişlerdir. Ülkemizde ve diğer ülkelerde avoparsinin büyüme faktörü olarak kullanımının yasaklanmasından sonra zamanla enterokoklarda vankomisin direncinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir.

Danimarka'da 1995-1997 yılına kadar virginiamisinin broyler çiftliklerindeki kullanımının artmasını takiben broylerlerdeki virginiamisin dirençli *E. faecium* oranı

1995 yılında %27,3 iken 1997 yılında %66,2 oranına çıkmıştır. 1999 yılında virginiamisin kullanımının yasaklanmasından sonraki 2000 yılında virginiamisin direnç oranının %33,9 düzeylerine düştüğü tespit edilmiştir (Aarestrup ve ark., 2001). Avrupa ülkelerindeki yasaklamalara rağmen İngiltere’de 2002-2003 yılları arasında yapılan bir çalışmada broylerlerde vankomisin dirençli *E. faecium* suşlarının kuinupristin/dalfopristine direnç oranı %50 olarak saptanmıştır (Garcia-Migura ve ark., 2005). Portekiz’de 2004 yılında yapılan bir çalışmada; tavuk dışkılarından toplanan *E. faecium* izolatlarında %33 oranında kuinupristin/dalfopristin direnci olduğu bildirilmiştir (Poeta ve ark., 2006a). Virginiamisinin kullanıldığı yıllarda kuinupristin/dalfopristin direncinin yüksek olduğu, yasaklamalardan birkaç yıl sonra direnç oranlarının düştüğü görülmektedir (Hersberger ve ark., 2005). Ülkemizde kuinupristin/dalfopristin direnci, diğer ülkelere göre daha düşük oranlarda tespit edilmiştir. Bunu nedeni kuinupristin/dalfopristin’in kullanımının ülkemizde daha az olmasıdır (Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Hersberger ve ark. (2005) Amerika Birleşik Devletleri’nde, virginiamisin kullanılan tavuk çiftliklerinden izole ettikleri *E. faecium* suşlarında kuinupristin/dalfopristin direncinin %85, antibiyotik kullanılmayan çiftliklerden izole edilen *E. faecium* suşlarında kuinupristin/dalfopristin direncinin ise %38 (6/16) oranlarında olduğunu tespit etmişlerdir. Antibiyotik kullanılmayan çiftliklerde düşük oranlarda direnç olmasının nedeninin çiftlikte çalışan insanların dirençli enterokokların çiftlikten çiftliğe yayılmasında potansiyel bir rezervuar rolü oynamasından kaynaklanabileceğine dikkat çekmişlerdir. Antibiyotik dirençli enterokokların hayvanlardan insanlara geçtiği, insan ve hayvan enterokok suşları arasında direnç gen transferleri olduğu ve dirençli enterokok suşlarının çiftlikte çalışan insanlarda da kolonize olduğu bildirilmiştir (Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Virginiamisinin yem katkı maddesi olarak kullanılmamasına rağmen hala kuinupristin/dalfopristin’e direnç görülmesi broylerlerin kesime gönderildiği rotasyonlar arasında kümeslerin temizlenmesi ve enfeksiyonlardan arındırılmasına rağmen dirençli bakteri klonlarının hala yaşamlarını devam ettirebilmesi sebebiyle

kümeslere ard arda gelen broyler sürüleri arasında dirençli enterokokların transfer olduğu şeklinde açıklanmıştır (Heuer ve ark., 2002; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Singh ve ark. (2002), *E. faecalis* izolatlarının kuinupristin/dalfopristin kombinasyonuna yüksek oranda direnç göstermesinin intrinsik dirençli olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir. Joseph ve ark. (2001), *E. faecalis* suşlarının kuinupristin/dalfopristine %97, Hayes ve ark. (2004), %96, Doğanay ve Kizirgil (2007) %47,4 oranında dirençli olduğunu rapor etmişlerdir.

Enterokokların yüksek düzey klindamisin ve aminoglikozid, glikopeptid,  $\beta$ -laktam, eritromisin, tetrasiklin, florokinolon ve kloramfenikollere karşı sonradan kazandığı antibiyotik direncinin konjugatif ve nonkonjugatif plazmid ve transpozon üzerinde bulunan direnç kodlayan genlerden olduğu bildirilmiştir (Radu ve ark., 2001; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Son ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada; çoklu antibiyotik direnç gösteren 19 *E. faecium* suşunun 4'ün de tekli plazmid bantları, 11'inde küçük ikili plazmid bantları bulunduğunu ve 4 suşta plazmid bantı tespit edilmediği bildirmişlerdir. Jackson ve ark. (2004); eritromisin dirençli enterokok suşunda tekli plazmid bantları, Kolář ve Sustakova (2002) ise; vankomisin dirençli enterokok suşunda farklı büyüklükte ikili, üçlü ve dörtlü plazmid bantları olduğunu tespit etmişlerdir. Dilik ve İstanbulluoğlu (2010); elde ettikleri verilere göre antibiyotik dirençli 50 enterokok suşunun 22 (%44)'sinde 8 farklı büyüklükte plazmid belirlemiş ve bunların 9 plazmid paternine ayrıldığını bildirmişlerdir. Tekli veya çoklu antibiyotik dirençli enterokok izolatlarında plazmid görülmesi, antibiyotik direnci ile plazmidler arasında bağlantı olduğunu desteklemektedir.

Dilik ve İstanbulluoğlu (2010); enterokok suşlarının %56'sında plazmid saptanamadığını bildirmişler. Radu ve ark. (2001); tavuk orijinli kaynaklardan izole edilen enterokok suşunun %45,8'inde plazmid bantları tespit edemediklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, enterokok suşlarının yarısından azında plazmid bantlarının bulunamamasına karşın bu suşların çoklu antibiyotik direnç oranlarının yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Plazmid içeren ve içermeyen antibiyotik (vankomisin) dirençli enterokok suşlarının, virülens faktörlerini ve antibiyotik direnç

özelliklerini etkili gen transfer mekanizmaları ile aktarabilmesi nedeniyle bu bakterilerin önemli risk taşıdıklarını belirtmişlerdir.

Ke ve ark. (1999) Kanada’da; 159 enterokok türü tespit etmişlerdir. Bunların 61 *E. faecium*, 77 *E. faecalis*, 9 *E. gallinarum* ve 12 *E. casseliflavus* olarak identifiye etmişlerdir. Çalışmada nozokomiyal enfeksiyonlarda artış görülmesi ile birlikte PCR yönteminin hızlı teşhiste kullanılabilirliği araştırılmıştır. Konvansiyonel yöntemlerle enterokok tayini 2-3 gün arasında yapıldığı bildirilmiştir. PCR ile yapılan teşhiste ise kültür kullanmaksızın 1-2 saat içerisinde teşhis yapılabildiği ortaya konulmuştur. Bunun dışında moleküler yöntemler elektroforez, ribozomal DNA amplifikasyonu ve DNA amplifikasyonu enterokokların tür düzeyinde belirlenmesinde önemli görülmüştür. Özellikle 5S *rRNA*, 16S *rRNA* ve 23S *rRNA* genlerinin belirlenmesiyle kültür doğrulaması yapılmıştır.

Pérez-Hernandez ve ark. (2002) İspanya’da; nozokomiyal enfeksiyonlarda toplam 46 VRE izolasyonu yapmışlar ve bunlardan 25 *E. faecalis*, 14 *E. faecium*, 3 *E. avium*, 2 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* belirlemişlerdir. Bu izolatların multipleks PCR ile 16S *rRNA* ve *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* vankomisin direnç genlerini analiz etmişlerdir. Multipleks PCR yönteminin teşhis amaçlı hızlı sonuç vermesi bakımından kullanılabilir olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yetkin ve ark. (2004) Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği’nde, 68 yaşındaki erkek bir hastada ilk olarak hastaneye ait bir VRE izolasyonu yapmışlardır. İdrar ve BOS kültürlerinde üreme saptanmayan hastanın kan kültüründe vankomisine dirençli *E. faecium* üretilmiştir. PCR yöntemi ile bu izolatın *vanA* tipi dirence sahip olduğu ortaya konulmuştur. Glikopeptit antibiyotiklere dirençli olmasının yanında yüksek düzey gentamisin, penisilin, kloramfenikol direnci saptanmıştır. Levofloksasin ve tetrasikline duyarlılık saptanmış ve tedavi bu iki ilaç ile gerçekleştirilmiştir.

Song ve ark. (2006) Kore Cumhuriyeti’nde 59 vankomisin dirençli *E. faecium* izolatı toplamışlardır. İzolatların glikopeptid direnci, *esp* profili ve *Tn1546* elementinin yapısal analizi genotipik olarak araştırılmıştır. 5 hastaneden toplanan 59 *E. faecium* izolatının 9 tanesinin (%15,3) VanB fenotipi göstermesine rağmen *vanA*

geni içerdği görülmüştür. Bir hastaneden elde edilen 3 izolatın *esp* profili gösterdiği, aynı zamanda *vanA* ve *vanB* genlerini taşıdığı da ortaya konulmuştur. Bu bilgiler ışığında Kore Cumhuriyeti hastanelerinde glikopeptit direnci için fenotipik ve genotipik özellikler bakımından VREF izolatlarının yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. 59 izolatın antibiyotik duyarlılık testi için vankomisin, teikoplanin, ampisilin, tetrasiklin, eritromisin, siprofloksasin, kloramfenikol, rifampin, kuinupristin/dalfopristin, streptomisin ve gentamisin kullanılmıştır. Streptomisin ve gentamisine karşı yüksek direnç tespit edilmiştir. Glikopeptit direnci için genotipik olarak PCR yöntemi kullanılmıştır. Çift PCR kullanılarak *E. faecium*'a ait iki farklı virulans faktörü (*esp* ve *hyl* genleri) belirlenmiştir. Tüm izolatların *vanA* geni taşıdığı ortaya konulmuş, 9 izolatın %15,3 invitro duyarlılık testi ile Van B fenotipi gösterdiği ortaya konulmuştur. Araştırmada ilk olarak Kore Cumhuriyeti, Japonya ve Tayvan'daki yapılan araştırmalara göre bu kadar yüksek VREF izolasyonu yapılmıştır. Çalışmada ayrıca 59 izolatın 53'ünün (%89,8) *esp* geni taşıdığı belirlenmiştir. Van A-Van A VREF ve Van B-Van A VREF izolatları olmak üzere iki grup tanımlanmıştır. Van A-Van A VREF izolatlarının ampisilin, eritromisin, siprofloksasin, rifampin, vankomisin ve teikoplanine yüksek direnç gösterdiği belirlenmiştir. Ancak %66,7 Van B-Van A VREF izolatının eritromisine direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Streptomisine yüksek direnç Van A-VanA VREF %72 olarak tespit edilmiştir. Van B-Van A VREF'de ise streptomisin direncinin %55,6 olduğu görülmüştür.

Deshpande ve ark. (2007) Amerika kıtasında, ABD ve Kanada'dan 26 farklı bölgeden sağlanan 839 VRE ve Avrupa'dan 10 farklı bölgeden elde edilmiş 56 VRE izolatı CLSI standartlarında duyarlılık testi ile test etmişlerdir. *E. faecium* %91 ve *E. faecalis* %7,8 olmak üzere en çok izole edilen türler olmuştur. Araştırmada Kuzey Amerika'da %76 olan *vanA* genine sahip VRE oranlarının Avrupa'da %40 olduğu belirlenmiştir. Vankomisin dirençli *E. faecium*'larda %76 oranında *esp* geni taşıdığı ortaya konulmuştur.

Lucet ve ark. (2007); Fransa Üniversite Hastanesi'nde vankomisin dirençli enterokokların sebep olduğu salgınların hızlı kontrol altına alınması için çalışma

yapmışlardır. Vankomisin dirençli enterokoklar Avrupa'nın birçok ülkesinde önemli nozokomiyal hastane enfeksiyonlarına sebep olduğu gibi bu hastanede de önemli enfeksiyonlara sebep olmuştur. Son 15 yıldır yapılan çalışmalarda Avrupa'ya göre Amerika kıtasında enterokok salgınları yoğun bakım ünitelerinde çok daha fazla görülmüştür. National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS) 2003 yılında enterokokların sebep olduğu nozokomiyal enfeksiyonların oranının %28,5 olarak bildirmiştir. Bu oran Avrupa'ya göre daha fazladır. Fransa Üniversitesi Hastanesi'nde ise oluşan bir VRE salgınında dört hafta boyunca VRE oranları tespit edilmiştir. 446 rektal sıvapta 37 hastada (%8,5) VRE kolonizasyonu tespit edilmiştir. Birinci hafta %70 olan VRE oranı, ikinci hafta alınan sıvaplarda %20'ye, üçüncü hafta alınan sıvaplarda %18,8'e ve 4. hafta alınan örneklerde %1,6'ya düşmüştür. 38 hastaya ait VRE izolatlarının üriner sistem, iç hastalıkları, romatoloji, haemodiyaliz ve acil yoğun bakımlarından izole edildiği tespit edilmiştir. Tüm VRE'lerin *E. faecium* olduğu ve yapılan PCR analizinde *vanA* geni taşıdığı ortaya konulmuştur. Doğrulama amaçlı RAPD ve PFGE başarılı bir şekilde kullanıldığını belirtmişlerdir.

Çin Halk Cumhuriyeti'nde yapılan bir araştırmada (Gu ve ark., 2009); VanB fenotip - VanA genotipine sahip vankomisin dirençli *E. faecium* izolasyonu araştırılmıştır. Çalışmada Beijing hastanesinde 23 izolat VanA genotipinde, 12 izolat VanB fenotip - VanA genotipinde olarak belirlenmiştir. 2 izolat VanA fenotip - vanA genotipine sahip VREF olarak identifiye edilmiştir.

Dendle ve ark. (2009) İngiltere'de yaptıkları çalışmada; VanA ve VanB taşıyan *E. faecium*'ların sebep oldukları vankomisin dirençli enterokok salgınlarını araştırmışlardır. 480 yataklı olan hastanede VRE hastalarla kontakt halinde olan insanlarda idrar kültürü yoğun bakım üniteleri karaciğer transplantına sahip hastalar ve diyareli yatalak hastaların hepsinden dışkı örnekleri toplanmıştır. *vanA*, *vanB* ve *vanC* genleri multipleks PCR yöntemi ile ortaya konulmuştur. Multipleks PCR ile *vanA* ve *vanB* pozitif bulunan bakteriler tekrar PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. 12 boyunca yapılan takipte 6 izolatın *vanA* + *vanB* geni taşıdığı buna karşılık daha yüksek oranda *vanB* geni taşıyan *E. faecium* izolatı (138) taşıdığı ve *vanA* geni taşıyan *E. faecium* izolatlarının ise 12 izolat olduğu tespit edilmiştir. VanA + VanB kolonize hastaların en çok onkoloji bölümlerinde tespiti yapılmıştır. Diğer izolatların

ise radyoloji ve yoğun bakım hastalarından izole edildiği belirlenmiştir. VRE'li hastalar özel olarak takip edilmiştir. VanA - VRE ve VanA + VanB - VRE hastalarda salgınları doğrulanmasına rağmen Van A + VanB - VRE 6 ay sonra tekrar bireylerden alınarak tekrar izole edilmiştir.

Tavukların enterokokkal florasının coğrafik bölgelere, yaş ve izolasyon metotlarının farklılıklarına göre sıklıklarının değişebilmesine karşı belirli türleri içerdiği bildirilmiştir (Devriese ve ark., 1991, Hayes ve ark., 2004, Jackson ve ark., 2004). İzole ve identifiye edilen enterokok türlerinin dağılımı insanlarda hastalıklara neden olan türlere benzerlikleri bakımından önem taşımaktadır. İnsanlarda enterokok enfeksiyonlarını %85-89'unu *E. faecalis*, %10-15'ini *E. faecium*, %5'ten az oranda *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. avium* ve *E. raffinosus* türleri oluşturmaktadır (Koneman ve ark., 1997; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010).

Bu araştırmada, köy tavuklarından 192 (%38,4) enterokok türü izole edildi. Yapılan identifikasyon sonucu 41 (%21,3) izolatın *Enterococcus faecalis*, 110 (%57,2) izolatın *Enterococcus faecium*, 27 (%14) izolatın *Enterococcus hirae*, 9 (%4,6) izolatın *Enterococcus casseliflavus/gallinarum* ve 5 (%2,6) izolatın *Enterococcus durans* olduğu tespit edildi. Bu enterokok türlerinin insan ve hayvan sağlığı için risk oluşturan mikroorganizmalar olması önemli olarak değerlendirildi. İzole ve identifiye edilen 192 enterokok türünün 32 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilik/duyarlılık durumları değerlendirildi. Yapılan analiz sonucu en düşük direncin imipeneme %2, basitrasine %2,6, tetrasikline %19, fusidik aside %19,3 ve ampisiline %32,8 olduğu tespit edildi. En yüksek direncin amikasinine %87, kanamisinine %98,4 ve oksasiline %98 olduğu tespit edildi. Ayrıca sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı direncinde yüksek olduğu tespit edildi. 1 izolatın vankomisine ve teikoplanine yüksek direnç gösterdiği belirlendi ve bu izolatın PCR ile analizde *vanA* geni taşıyan *E. faecalis* olduğu tespit edildi. 7 izolatın ise vankomisine düşük direnç gösterdiği ve teikoplanine duyarlı olduğu tespit edildi. PCR ile yapılan analizde bu izolatların *vanC1* (2 izolat) ve *vanC2/3* (5 izolat) geni taşıdığı belirlendi. İzole edilen 192 enterokok türünden sadece 1 tanesinin aktarılabılır dirence sahip olduğu tespit edildi. Doğal direnç genlerinin daha yaygın olduğu belirlendi. 16S rRNA ile türlerin genotipik doğrulaması PCR ile başarılı bir şekilde yapıldı. PCR

yöntemi ile yapılan *Esp* geni taşıyıcılığı taramasında 192 izolatın hiçbirinin bu geni taşımadığı tespit edildi. Köy tavukları dışkı örnekleri antibiyotik kullanılmayan 10-50 adet arasında tavuk içeren kümeslerden toplandı. Bu kümeslerdeki köy tavukları yem katkı maddeleri içermeyen doğal besinlerle (buğday, arpa vb.) beslenmektedir. Çalışmada köy tavuklarında antibiyotik direnç oranlarının değişik düzeylerde olmasının nedeninin dirençli suşların bakıcılardan ve diğer hayvanlardan bulaşmaya bağlı şekillendiği düşünülmektedir.

Dünya çapında sınırlı sayıda araştırmada evcil ve yabani hayvanlar arasında dirençli bakteri aktarımı ve gen özellikleri arasında farklılıklar ortaya konulabilmiştir. Yabani hayvanlara direncin geçişi noktasında önemli görülen çevresel kontaminasyon ile ilgili detaylı bilgilerde çok azdır. Bu konularla ilgili, Kore Cumhuriyeti'nde yaptıkları çalışmada (Nam ve ark., 2013); enterokok türlerini belirlerken üç su sistemi içerisinde dışkı ile kontamine otuzüç bölgeden örnekleme yapılmıştır. Üç büyük su sisteminden 132 örneğin 41 'inde (%31) enterokok belirlemişlerdir. *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* gen primerleri ile mPCR kullanarak örnekleri analiz edilmiştir. 132 örneğin 17'si VRE olarak tespit edilmiştir. 216 koloni örneğinde, 64 (%29,6) VanC genotipine sahip enterokok belirlenmiştir. 1 izolat *16S rRNA* analizi yoluyla *E. gallinarum* olarak tespit edilmiştir. Diğer 63 izolat ise VanC2/3 genotipine sahip olan *E. casseliflavus* olarak identifiye edilmiştir. *vanA* ve *vanB* genleri tespit edilmemiştir. Multipleks PCR yönteminin etkinliği bu çalışmada başarılı bir şekilde ortaya konulmuştur.

Mallon ve ark. (2002) İngiltere'de 1997-2000 yılları arasında ağaç faresi ve tarla faresi gibi yabani memelilerde aldıkları dışkı örneklerini *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3* ve *vanD* genlerini açısından mPCR yöntemi ile araştırmışlardır. 388 tarla faresi örneğinden %82, 165 ağaç faresi örneğinden %75 enterokok izolasyonu yaptıklarını bildirmişlerdir. Vankomisin dirençli enterokokları ağaç farelerinde %4,6, tarla farelerinde ise %1,2 oranında saptamışlardır. Araştırmacılar tüm izolatların *vanA* geni taşıyan *E. faecium* olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Portekiz'de yapılan bir çalışmada (Rodrigues ve ark., 2002); 85 köpek ve 19 kediden toplanan örneklerden 104 enterokok türü izole edilmiştir. Yapılan

identifikasyonda *E. faecium* 60 izolat (%84 kedi ve %52 köpek), *E. avium* 43 izolat (%47 köpek ve %16 kedi) olduğu ve 1 izolatın ise *E. faecalis* (köpek) olduğu tespit edilmiştir. *E. avium* izolatlarının daha çok köy kedi ve köpek örneklerinde görüldüğü tespit edilmişken, *E. faecium* izolatlarının kent kedi ve köpek örneklerinde daha çok görüldüğü tespit edilmiştir. Ampisilin, piperasilin, cefoperazon, amoksisilin, amoksisilin + klavuklonik asit, oksasilin, imipenem, nalidiksik asit, ofloksasin, siprofloksasin, enrofloksasin, tetrasiklin, linkomisin, eritromisin, vankomisin dirençlilikleri tespit edilmiştir. En etkili antibiyotiklerin imipenen ve amoksisilin + klavuklonik asit olduğu tespit edilmiş ve izolatların (104) sadece %1,9'unun bu ilaçlara dirençli olduğu bildirilmiştir. Bunu takiben ise amoksisilin (%4,8), piperasilin (%13,5) ve ampisilin %21,2 direncin olduğu rapor edilmiştir. 3. kuşak sefalosporinler (safoperazon ve oksasilin) karşı %100 direnç olduğu belirtilmiştir. Tüm izolatların nalidiksik aside dirençli olduğu ve enrofloksasine (%76,9), siprofloksasin (%73,1) ve ofloksasin (%64,4) şeklinde direnç ortaya koydukları belirlenmiştir. *E. faecalis* izolatlarında da bu antibiyotiklere karşı direnç görülmüş, en yüksek direncin %95,2 oranında tetrasiklin olduğu gösterilmiştir. %98,1 linkomisin direnci olduğu belirlenmiştir. Suşlar %100 eritromisin direnci gösterirken, %100 vankomisine duyarlılık rapor edilmiştir. Yapılan PCR analizinde hiçbir izolatta vankomisin direnci tespit edilmemiştir.

Bölgemizde enterokokların izolasyonu ve virulans faktörlerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır. İnsan, kedi ve köpek dışkılarından enterokok türlerinin izolasyonu ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada (Boynukara ve ark., 2002), 400 dışkı örneğinin 230 (%57,5)'undan enterokok izole edilmiştir. İzolatların 46 (%63,5)'sı *E. faecium*, 32 (%13,9)'u *E. faecalis*, 17 (%7,4)'si *E. raffinosus*, 13 (%5,6)'ü *E. hirae*, 11 (%4,8)'i *E. dispar*, 10 (%4,3)'u *E. gallinarum* ve 1 (%0,4) *E. solitarius* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen suşların amoksisiline %96, ampisiline %95,2, vankomisine %91,3, penisiline %88,6, norfloksasine %88,6, siprofloksasine %80,6, eritromisine %63,9, sefalotine %62,1, oksitetrasikline %50,4, basitrasine %50 ve kanamisine %7,3 oranında duyarlı, suşların tamamının ise nalidiksik aside dirençli olduğu bildirilmiştir. Gülhan ve ark. (2007) insan, kedi, köpek orijinli 146'sı *E. faecium* ve 32'si *E. faecalis*

olmak üzere toplam 178 enterokok suşunun jelatinaz (gelE), agregasyon substans (AS), sitolizin ve lam hemaglutinasyon (HA) testi ile tavşan ve insan eritrositlerine karşı aglutinasyon özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında pozitiflik yüzdelerinin sırasıyla gelE için %17,1, %37,5; AS için %13, %12,5; sitolizin için %7,5, %12,5; tavşan eritrositleri ile HA değerlerini %9,6, %9,4; insan eritrositleri ile HA sonuçlarını ise %17,1, %21,9 olduğunu rapor etmişlerdir.

Poeta ve ark. (2008) Portekiz’de yaptıkları çalışmada; yabani domuzlardan elde ettikleri dışkı örneklerinde 39 *E. faecium*, 24 *E. hirae*, 2 *E. faecalis* ve 2 diğer enterokok alt türleri olmak üzere toplam 67 enterokok türü tespit etmişlerdir. Bunların PCR yöntemi ile virulans faktör genlerini taşıyıp taşımadıklarını analiz etmişlerdir. Enterokoklara ait başta *esp* olmak üzere birçok virulans faktör araştırmışlardır. Bu enterokok türlerinin *esp* geni taşıyıcılığı analizi sonucunda hiçbirinin bu geni taşımadığı ortaya konulmuştur.

Radhouani ve ark. (2010) akbabalardan (*B. buteo*) Eylül 2007 - Şubat 2009 arasında 33 fekal örnek toplamışlar ve bu dışkı örneklerinde VRE varlığını araştırmışlardır. Vankomisin, teikoplanin, ampisilin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, kuinupristin/dalfopristin ve siprofloksasine duyarlılıklarını disk difüzyon metodu kullanarak ortaya koymuşlardır. Vankomisin direnç genlerinden *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3* ve *vanD* genlerine PCR yöntemi kullanılarak değerlendirme yapmışlardır. *gelE*, *fsr*, *esp*, *hyl* ve *cyl* gibi virulans faktör ile ilgili genlerin varlığı PCR metodu ile araştırmışlardır. VRE varlığı 33 örneğin 3’ünde (%9) belirlenmiştir. Bu örneklerden de her bir örnekte 2 VRE izolatu elde edilerek identifikasyonu yapılmıştır. Toplamda 6 izolat VRE olarak tanımlanmıştır. Bunların 2 tanesi *E. faecium* ve 4 tanesi *E. durans* olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlardan biri *E. durans*’ın baskın bir tür olduğudur. Diğer farklı sonuç ise 3 pozitif örnekten 2’sinden elde edilen isolatların aynı anda *vanA* geni içeren enterokok türlerini barındırmasıdır. Bu durum intestinal sistemlerinde farklı mikroorganizmaların aynı anda *vanA* geni taşıdığı düşüncesini desteklemektedir.

*vanA* geni içeren izolatların tamamının karakteristik olarak vankomisine ve teikoplanine yüksek direnç gösterdiği görülmüştür. Tüm izolatların tetrasikline ve eritromisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu suşların 5'inde ise siprofloksasin ve ampisiline aynı anda dirençli olduğu görülmüştür. 4 izolatın kuinupristin/dalfopristin direnci olduğu görülmüştür. 1 izolatın kanamisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Çok az çalışmada gıda ve hayvan orijinli enterokoklarda virulans faktörlerin varlığı çalışılmıştır. Çok az çalışmada da yabani hayvanlardan izole edilen mikroorganizmalar üzerine yoğunlaşmış ve bunların taşıdıkları virulans faktör genleri üzerine çalışma yapılmıştır. İntrinsik vankomisin direnci ile ilgili yapılan değerlendirmede 33 fekal örneğin 9'unda (%27,3) pozitiflik bulunmuş ve her bir örnekten 1 izolat daha ileri aşamada belirlenmek üzere identifiye edilmiştir. 9 enterokokun tamamı *E. gallinarum* olarak tanımlanmış ve *vanC1* geni içerdiği belirlenmiştir. Yapılan virulans faktörleri değerlendirmesinde hiçbir izolatın *esp* geni taşımadığı belirlenmiştir.

Silva ve ark. (2010) Portekiz'de yaptıkları çalışmada; Avrupa yabani tavşanları 77 intestinal örnekten 64 (%83,1) enterokok izole etmişlerdir. Antimikrobiyel ajanlara karşı duyarlılık ve direnç analizleri yapmışlardır. Enterokokal izolatların tür analizlerini yapmışlar ve en yaygın tür olarak *E. faecalis* (39 izolat) belirlenmiş, bunu takiben *E. faecium* (21 izolat) ve *E. hirae* (4 izolat) belirlemişlerdir. Vankomisin, teikoplanin, ampisilin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, sipfloksasin ve kuinupristin/dalfopristin ilaçlarına karşı duyarlılıklar CLSI 2008 kriterlerine göre disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. İzolatların ¼'ünden fazlası (%29,7) tetrasikline, %20,3'ü eritromisine, %14,1'i siprofloksasine ve %10'dan azı ise yüksek dozda gentamisin-streptomisine dirençli olduğu gösterilmiştir. Enterokok izolatlarında vankomisin, kloramfenikol ve teikoplanin direnci görülmemiştir. *E. faecalis* izolatlarının %66,7'si ve *E. faecium* izolatlarının %38,1'i tüm antibiyotiklere duyarlı olarak belirlenmiştir. Bunlara ek olarak *E. hirae*'nin (4 izolat) tamamı tetrasikline dirençli olarak tespit edilmiştir. Toplam olarak enterokok izolatlarından 7 tanesinde multi direnç tespit edilmiştir.

Gonçalves ve ark. (2013); İber vaşağında 30 fekal rnekden 27 enterokok türü izole etmişlerdir. Bu izolatlar antimikrobiyel direncin moleküler metabolizması ve virulans genlerinin varlığı bakımından test edilmiştir. Enterokoklar arasında *E. faecium* ve *E. hirae* izole edilen bakteriler olarak tespit edilmiştir (11 izolat). Bunu takiben *E. faecalis* (5 izolat) olarak identifiye edilmiştir. Enterokok izolatları arasında tetrasiklin %33 ve eritromisin %30 oranla en yüksek direncin olduğu belirlenmiştir. Disk difüzyon testi ile bakterilerin duyarlılıkları test edilmiştir. Vankomisin, teikoplanin, ampisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin, siprofloksasin, streptomisin ve kuinupristin/dalfopristin test edilmiştir. Yüksek dirençteki aminoglikozid durumu da değerlendirilmiştir. Ek olarak virulans faktör genleri PCR ile test edilmiş ve enterokoklarda *esp* yüzey molekülüne rastlanmamıştır. Bu çalışmada 27 enterokok izolatından 16 tanesindeki duyarlılık test edilmiştir (8 *E. hirae*, 6 *E. faecium* ve 2 *E. faecalis*) ve ampisilin, kloramfenikol, vankomisin ve teikoplanine direnç görülmemiştir. Kuinupristin/dalfopristine karşı 1 *E. faecalis* izolatı dirençli görülmüştür. %33 tetrasiklin, %30 eritromisine direnç görülmüştür. Daha düşük olarak ise %7 siprofloksasin, %7 streptomisin, %7 kanamisin ve %4 gentamisin karşı direnç tespit edilmiştir.

Santos ve ark. (2013); antibiyotik direnci, insan ve hayvan sağlığında birincil öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ancak evresel rezervuarlarda bu konu ile ilgili bilgiler henüz yeterli olmadığını vurgulamışlardır. Özelikle yabani kanatlı popülasyonunda antibiyotik dirençli bakteri görülme oranı hala bilinmemektedir. Bu amaçla enterokok ve *E. coli* antibiyotik direncinin belirlenmesi dışkı örneklerinde araştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada; toplam 208 adet fekal örnek toplamışlar, 9 passerine türden 178 fekal örnek ve 2 av kuşu türünden 40 örnek toplanmıştır. Başlangıç olarak sis ağları ve halkalar (tuzak) kullanılarak toplanmıştır. Fekal rnekler steril kaplara ve kloakal sıvıplar ise farklı steril kaplara olacak şekilde ayarlanmıştır. Av kuşlarından bıldırcın ve su ulluğu en çok toplanan fekal örneklerin başında gelmektedir. Analiz edilen örneklerde 138 (%63,3) adet enterokok izolasyonu yapılmıştır. *E. faecalis* 59, *E. faecium* 40, *E. durans* 27 ve *E. hirae* 12 olmak üzere identifikasyon yapılmıştır. Antimikrobiyel duyarlılık için disk difüzyon testi yapılmıştır. Enterokokların vankomisin, teikoplanin, ampisilini, streptomisin,

gentamisin, kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, kuinupristin/dalfopristin, siprofloksasin antibiyotikleri ile birlikte yüksek düzeyde gentamisin-kanamisin-streptomisin dirençliliklerine bakılmıştır. PCR kullanılarak *vanA*, *vanD* ve *vanE* direnç genleri analiz edilmiştir. Enterokok izolatlarının %46,4'ünün antibiyotiklere dirençli oldukları tespit edilmiştir. Tetrasiklin (%32,6) siprofloksasin (%15,9) ve eritromisin (%11,6) direnç oranları ile yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Diğer antimikrobiyel ajanlara karşı %10'dan daha az direnç olduğu görülmüştür. Gentamisin, streptomisin ve kanamisine karşı direnç olmadığı belirlenmiştir. Sadece 1 *E. faecalis* izolatında direnç belirlenmiş, aynı zamanda yüksek oranda teikoplanin direnci de tespit edilmiştir. Yapılan PCR ile analizde *vanA* direnç genini taşıdığı tespit edilmiştir. Antimikrobiyel direncin fenotipik değerlendirilmesinde *E. faecium* %57,5 ve *E. durans* %63'ünün test edilen antibiyotiklerden en az bir tanesine direnç gösterdiği belirlenmiştir. 8 enterokok izolatının multi dirençli olduğu tespit edilmiştir. *E. faecalis* ve *E. hirae* izolatının ise test edilen birçok antibiyotiğe duyarlı olduğu görülmüştür.

Oravcova ve ark. (2013); 2010 ve 2011 arası boyunca toplanan karga dışkı örneklerinden VRE karakteri ve görülme sıklığını (prevalans) araştırmışlardır. Dışkı örnekleri selektif kültürle değerlendirilmiş ve karakterize edilmiştir. *vanA* geni içeren VRE epidemiyolojik ilişkilerini belirlemek için PFGE ve Multilocus Sequence Typing (MLST) kullanılmıştır. 1073 karga dışkı örneğinde 62 (%6) VRE özelliği tespit edilmiştir. Bunlardan *E. gallinarum* 48 (%77), *E. faecium* 9 (%15) ve *E. faecalis* 5 (%8) izole edilmiştir. 7 izolatın Çek Cumhuriyeti, 1 tanesinin Almanya'da olduğu rapor edilmiştir. PCR ile yapılan *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/3* gen analizinde 47 izolat *vanC1*, 8 izolat *vanA*, 1 izolat *vanC2* geni tespit edilmiş, fakat hiçbir izolatta *vanB* genine rastlanılmamıştır. *vanA* geni tespit edilen VRE izolatlarının tamamı *E. faecium* olarak identifiye edilmiştir. Toplam 43 (%71) izolatın bir veya daha fazla ilaca direnç göstermiştir. Gentamisin (20), tetrasiklin (19), eritromisin (18), ampicilin (13), kloramfenikol (4) ve siprofloksasine direnç görülmüştür.

Gülhan ve ark. (2012) Van Gölü Havzasındaki sulak alanlarda yabani ördek ve martılara ait 357 dışkı örneğini enterik bakteriler yönünden incelemişlerdir. İncelenen dışkı örneklerinden izole edilen enterokokların 23'ünün (%6,4) *E. faecium* ve 7'sinin (%2) de *E. faecalis* olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, izolatları bilinen virulans faktörleri açısından araştırmış ve 23 *E. faecium* suşunun 18 (%78,3)'i jelatinaz, 4 (%17,4)'ü sitolizin, 2 (%8,7)'si agregasyon substans (AS), 7 *E. faecalis* suşunun ise 4 (%57,1) jelatinaz ve sitolizin, 1 (%14,3)'i de AS açısından pozitif bulmuşlardır.

Bu çalışmada yabani kanatlı olarak martılarda VRE varlığı ve direnç gen özellikleri araştırıldı. İzolasyon sonucu toplam 119 adet enterokok türü elde edildi. 78 izolatın (%65,5) *E. faecalis*, 21 izolatın (%17,6) *E. faecium*, 10 izolatın (%8,4) *E. hirae*, 7 izolatın (%5,8) *E. casseliflavus/gallinarium*, 2 izolatın (%1,6) *E. raffinosus* ve 1 izolatın (%0,8) *E. durans* olduğu tespit edildi. İzole ve identifiye edilen enterokok türlerinin insan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan mikroorganizmalar olması önemli bir sonuçtur. Martıların uzun mesafeler katedebilmesi, su ve karada yaşayan olması, diğer yabani hayvanlarla kontakt kurması ve insan popülasyonu ile en çok ilişki kuran hayvanlar olması düşünüldüğünde bu sonuçların önemli bir risk olduğu değerlendirildi. Yapılan antibiyotik duyarlılık testinde en yüksek direncin oksasiline (%96,6), amikasin (%94,9), kanamisin (%92,4), gentamisin (%82,3), tobramisine (%88,2) ve tetrasiklin (%63,02) olduğu ortaya konuldu. En düşük direncin ise imipenem (%0,8), ampisiline (%1,6), penisiline (%15,9) ve piperasiline (%18,4) olduğu tespit edildi. PCR ve mPCR ile yapılan vankomisin direnç analizinde 5 *E. faecalis* izolatının *vanA*, 3 *E. faecium* izolatının *vanA* ve 4 *E. casseliflavus/gallinarium* izolatının *vanC1* geni taşıdığı tespit edildi. İzolatların tamamı *vanB* ve *vanC2/3* genlerini açısından negatif bulundu. PCR yöntemi ile genotipik olarak 16S rRNA analizi başarılı bir şekilde yapıldı. PCR yöntemi ile yapılan *Esp* geni taramasında 119 izolatın hiçbirinin bu geni taşımadığı ortaya konuldu. Martılarda aktarılabılır direncin varlığı bu çalışmada tespit edildi. Bu bilgiler ışığında martı popülasyonlarının dirençli bakterilerin yayılmasında etkin olduğu, aynı zamanda insan ve hayvan sağlığı için risk

oluşturduğu görüldü. Dünyada klinik olarak önemli olan enterokokların yayılabilir ve çevresel kontaminasyon için risk oluşturabileceğine vurgusunun yapılması önemlidir.

Martı ve tavuk dışkılarından izole edilen enterokok türlerinin gösterdikleri farklılıklar, istatistiksel sonuçlar dikkate alınarak çalışmada ortaya konuldu. Tavuk dışkı örneklerinden 192 enterokok türü izole edilirken martı dışkı örneklerinden 119 enterokok türü izole edildi. Bu farklılığın yapılan istatistiksel analiz sonucu önemli olduğu ortaya konuldu. Martı dışkılarından yapılan izolasyon sonucu baskın türün %65,5 oranıyla *E. faecalis* olduğu saptandı. Tavuk dışkılarından yapılan izolasyon sonucunda ise baskın türün %57,3 oranla *E. faecium* olduğu görüldü. Martı dışkısından %1,6 oranında *E. raffinosus* türü izole edilirken, incelenen tavuk dışkılarında *E. raffinosus* türü izole edilmedi. Ancak bunun istatistiksel anlamda önemli olmadığı yapılan analizle ortaya konuldu. Martı dışkısından yapılan izolasyon sonucu elde edilen enterokokların imipenem (%0,8), ampisiline (%1,6), penisiline (%15,9) ve piperasiline (%18,4) en düşük direnci gösterdiği tespit edildi. Tavuk dışkılarından izole edilen enterokok türlerinde ise imipeneme %2, basitrasine %2,6, tetrasikline %19, fusidik aside %19,3 ve ampisiline %32,8 en düşük dirençliliğin olduğu belirlendi. Martılarda yapılan *van* genleri analizinde *vanA* geni taşıyan izolat oranı yüksek bulunmuşken, tavuklarda *van* genleri analizinde *vanC2/3* oranının daha yüksek olduğu bulundu. Martıların, tavuklara göre aktarılabilir direnç genini yüksek oranda taşıdığı tespit edildi.

Sonuç olarak, bu çalışmada Van Gölü Havzası ve çevresinde bulunan köy tavukları ve martılarda çoklu antibiyotik dirençli enterokok yönünden önemli bir rezervuar olduğu belirlendi. Köy tavukları ve martılardan izole edilen dirençli enterokok suşlarında farklı *van* genleri ve antibiyotik dirençliliği olduğu ortaya konuldu. Enterokok türlerinin antibiyotik direnç genlerini konjugasyon yoluyla insanlar için patojen olan bakterilere transfer etmesi önemli bir risk olarak değerlendirildi. Enterokokların sahip oldukları antibiyotik dirençliliğini kontamine tavuk gıdaları aracılığı ve martı dışkısı ile temas sonucu insanlara aktarabileceği düşünüldü.

Köy tavukları ve özellikle yabani hayvanlarda antibiyotiklere karşı direncin oluşması ve bakterilerdeki çoğul dirençliliğin engellenmesi için, ülke genelinde çok merkezli epidemiyolojik çalışmalar yapılarak patojen ve kommensal bakterilerdeki antibiyotik direnç durumunun ve gelişen direncin moleküler kökeninin sürekli takip edilmesi gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar Veteriner ve Beşeri Hekimlikte birlikte-paralel değerlendirilmeli ve ulusal antimikrobiyal kullanım stratejileri geliştirilmelidir.

İnsan popülasyonlarına çok yakın olan, kanatlı hayvan türleri başta olmak üzere, hayvanlarda özellikle çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip enterokok türlerinin belirlenmesi ve dağılımının ortaya konulması halk sağlığı açısından oldukça önemli olduğu için daha geniş çaplı araştırmalara gereksinim duyulduğu kanısına varıldı.

## ÖZET

**Akgül Ö, Tavuk ve Martı kaynaklı Enterokok türlerinin antibiyotik dirençliliğinin fenotipik ve genotipik analizi, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, 2014.** Bu çalışmada, Van ili ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklardan ve Van Gölü Havzasının değişik noktalarında insanlarla kontakt halinde olan martı popülasyonlarından alınan dışkı örnekleri enterokok türleri açısından incelendi. Bu amaçla 500 tavuk ve 500 martı olmak üzere toplam 1000 adet dışkı örneği toplandı. Çalışmada, tavuklara ait dışkı örneklerinden 192 (%38,4) ve martılardan sağlanan örneklerden ise 119 (%23,8) olmak üzere toplam 311 (%31,1) adet enterokok izole ve identifiye edildi. Tavuk orijinli izolatların 41'i (%21,3) *E. faecalis*, 110 (%57,2) *E. faecium*, 9 (%4,6) *E. casseliflavus/gallinarum*, 27 (%14) *E. hirae*, 5 (%2,6) *E. durans* olarak identifiye edilirken; martı orijinlilerin 78'i (%65,5) *E. faecalis*, 21 (%17,6) *E. faecium*, 10 (%8,4) *E. hirae*, 7 (%5,8) *E. casseliflavus/gallinarum*, 2 (%1,6) *E. raffinosus*, 1 (%0,8) *E. durans* olarak tanımlandı. Fenotipik olarak bilgisayar destekli Gram pozitif panellerde identifiye edilen enterokok türlerinin genotipik olarak doğrulanması 16S rRNA PCR analizi ile yapıldı. Tüm izolatların antibiyotik dirençlilikleri dikkate alındığında; en fazla dirençlilik oksasilin (%96,6), amikasin (%94,9), kanamisin (%92,4), gentamisin (%82,3), tobramisin (%88,2) ve tetrasikline (%63,02) en az dirençlilik ise imipenem (%0,8), ampisilin (%1,6), penisilin (%15,9) ve piperasiline (%18,4) karşı saptandı. İzolatların 9'u (%2,9) fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunurken; 20'sinde (%6,4) genotipik olarak vankomisin dirençlilik geni (*van*) belirlendi. Bunlardan 6 *E. faecalis* (1'i tavuk, 5'i martı orijinli) ve 3 *E. faecium* (martı orijinli) izolatının *vanA*, 6 *E. casseliflavus/gallinarum* izolatının *vanC1* (2'si tavuk, 4'ü martı orijinli) ve 5 *E. casseliflavus/gallinarum*'un (tavuk orijinli) ise *vanC2/3* geni taşıdığı tespit edildi. Martı izolatlarında *vanC2/3* genlerine raslanılamazken; tavuk ve martı orijinli tüm izolatlar *vanB* geni açısından negatif bulundu. Tavuk orijinli izolatlarda çoğul antibiyotik dirençliliği, martı orijinli olanlara göre daha düşük olduğu görüldü. Yapılan virulans faktör analizinde tavuk ve martılardan izole edilen enterokokların hiçbirinde *esp* geni tespit edilmedi. Sonuç olarak, bu araştırma ile bölgemizde ilk kez, Van ili ve çevresinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklarda ve Van Gölü Havzasında insanlarla temas halinde olan martılarda enterokok türlerinin tespiti yapıldı. Bu araştırmadan elde edilen verilerin konuyla ilgili gerçekleştirilecek daha sonraki ve ileri düzey çalışmalara önemli katkılar sağlayacağı umulmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Antibiyogram, Enterokok, Martı, Tavuk, VRE

## SUMMARY

**Akgül Ö, Phenotypic and genotypic analysis of Enterococcus species for antibiotic resistance chicken and gull originated, Yuzuncu Yıl University, Instituted of Health Sciences Ph.D Thesis in Department of Microbiology, Van, 2014.** In this study, faecal samples of home chickens in the city of Van and its districts and gulls in contact with humans in Van Lake basin have been obtained and examined for *Enterococcus* species. For this purpose 1000 faecal samples have been obtained as 500 from chickens and 500 from gulls. In the study, *Enterococcus* has been isolated and identified from a total of 311 (31,1%) faecal samples as 192 (38,4%) from chickens and 119 (23,8%) from gulls. 41 (21,3%) of chicken-origin isolates have been identified as *E. faecalis*, 110 (57,2%) as *E. faecium*, 9 (4,6%) as *E. casseliflavus/gallinarum*, 27 (14%) as *E. hirae*, 5 (2,6%) *E. durans* while 78 (65,5%) of gull-origin isolates have been identified as *E. faecalis*, 21 (17,6%) as *E. faecium*, 10 (8,4%) as *E. hirae*, 7 (5,8%) as *E. casseliflavus/gallinarum*, 2 (1,6%) as *E. raffinosus* and 1 (0,8%) as *E. durans*. Genotypic verification of enterococcus species have been identified phenotypically on computer-supported gram positive panels by 16S rRNA PCR analysis. When antibiotic resistance of whole isolates have been taken into consideration; the highest level of resistance was determined to oxacillin (96,6%), amikacin (94,9%), kanamycin (92,4%), gentamycin (82,3%), tobramycin (88,2%) and tetracycline (63,02%) while the lowest resistance was determined to imipenem (0,8%), ampicillin (1,6%), penicilin (15,9%) and piperacillin (18,4%). While 9 (2,9%) of the isolates have been determined as resistant to vancomycin; genotypically vancomycin resistance gene (*van*) has been determined 20 (6,4%) of the isolates. 6 of *E. faecalis* (1 chicken, 5 gull origin) and 3 of *E. faecium* (gull origin) isolates have been determined as carrying *VanA*, 6 *E. casseliflavus/gallinarum* as carrying *vanC1* (2 chicken, 4 gull origin) and 5 *E. casseliflavus/gallinarum* (chicken origin) as carrying *vanC2/3* gene. In gull isolates, while *vanC2/3* gene was not determined in gull isolates; all chicken and gull origin isolates have been found negative for *vanB* gene. In chicken origin isolates; multi antibiotic resistance level was lower than gull origin. According to virulence factor analysis, *esp* gene has not been determined in enterococcus species isolated from chicken and gulls. As a result, for the first time enterococcus species were determined in home chicken in city of Van and in gulls living in Van Lake basin in contact with humans. We hope that the datas obtained in this study will make a major contribution to further advanced studies.

**Keywords:** Antibiogram, Enterococcus, Gull, Chicken, VRE

## KAYNAKLAR

- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broylers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37, 2, 127-137.
- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F, (2001). Effect of abolishment of use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animal in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 7, 2054-2059.
- Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, Witte W, Kreth W, Schlegel PG, Claus H. (2006). Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 11, 4009-4013.
- Achtman M, van der Ende A, Zhu P, Koroleva IS, Kusecek B, Morelli G, Schuurman IG, Brieske N, Zurth K, Kostyukova NN, Platonov AE (2001). Molecular epidemiology of serogroup a meningitis in Moscow, 1969 to 1997. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 3, 420-427.
- Akçimen B (2010). Hastane infeksiyonlarından izole edilen vankomisin dirençli enterokokların pulsed field jel elektroforez yöntemiyle genotip tayini. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Aktaş G, Derbentli Ş (2009). Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi*, 23, 4, 201-209.
- Alp Ş, Şardan YÇ (2008). Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 89-95.
- Andrews F, Horder T (1906). A study of streptococci pathogenic for man. *Lancet*, 2, 708-713.

Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kerster K, Swings J, Dellaglio F (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*, 68, 303-316.

Arthur M, Courvalin P (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.37, 8, 1563.

Bakir M, Bova JL, Newell KA, Millis JM, Buell JF, Arnow PM (2001). Epidemiology and clinical consequences of vancomycin-resistant enterococci in liver transplant patients. *Transplantation*, 72, 1032-1037.

Baselski VS (1996). The role of molecular diagnostics in the clinical microbiology laboratory. *Clinics in Laboratory Medicine*, 16, 1, 49-60.

Başustaoğlu A (2004). Hayvan yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç gelişimindeki rolü. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 8, 286-291.

Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 34,4, 507-514.

Bayram G, Delialioğlu N, Emekdaş G (2011). Mersin ilinde tüketime sunulan etlerde izole edilen Enterokok türlerinin prevalansı ve tiplendirilmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4, 2, 2011.

Bedendo J, Pignatari AC (2000). Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 33, 1269-1274.

Bej AK, Mahbubani MH, Miller R, DiCesare JL, Haff L, Atlas RM (1990). Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Molecular and Cellular Probes*, 4, 5, 353-365.

Bejuk D, Begovac J, Gamsberger D, Kucisec-Tepes N (2000). Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an

example based algorithm. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38, 201-205.

Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, Sundsfjord A, Pruzzo C, Donelli G, Facinelli B (2007). VanA-type enterococci from humans, animals, and food: Species distribution, population structure, *Tn1546* typing and location, and virulence determinants. *Applied and Environment Microbiology*, 73, 10, 3307-3319.

Bilström H. Molecular epidemiology of clinical *E. faecium*. Carolinska Institutet. Thesis 2008.

Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA (2001). Vancomycin-resistant enterococci: Why are they here, and where do they come from? *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 314-325.

Borgen K, Sorum M, Wasteson Y, Kruse H (2001). VanA-type vancomycine-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 89-94.

Bostic GD, Perri MB, Thal LA, Zervos MJ (1998). Comparative in vitro and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 30, 2, 109-112.

Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR (2008). Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 7, 2667-2672.

Boynukara B, Ekin İH, Aksakal A, Gülhan T (2002). Isolation and antibiotic susceptibility of enterococci from human, dog and cat faeces. *Veteriner Hekimleri Mikrobiyolojisi Dergisi*, 2, 37-42.

Bozdogan B, Leclercq R (1999). Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43, 11, 2720-2725.

Brandl K, Plitas G, Mihiu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, Schnabl B, Dematteo RP, Pamer EG (2008). Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*, 455, 804-808.

Brisse S, Fussing V, Ridwan B, Verhoef J, Willems RJL (2002). Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1977-1984.

Burney S, Landman D, Quale JM (1994). Activity of clinafloxacin against multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 68-70.

Busani L, Del Grosso M, Paladini C, Graziani C, Pantosti A, Biavasco F, Caprioli A (2004). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and-resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *International journal of food microbiology*, 97, 1, 17-22.

Butaye P, Devriese LA, 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*, 45, 5, 1374-1378.

Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F (2003). Antimicrobial growth promoters in animal feed: Effects of less well known antibiotics on Gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 2, 175-188.

Butler KM (2006). Enterococcal infection in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 17, 128-139.

Canadian Nosocomial Infection Surveillance ProGram (CNISP) Surveillance for Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) in Patients Hospitalized in Canadian Acute-Care Hospitals Participating in CNISP 2006 Results.

Camargo ILBC, Barth AL, Pilger K, Seligman BGS, Machado ARL, Darini ALC (2004). *Enterococcus gallinarum* carrying the *vanA* gene cluster: first report in Brazil. *Brazilian journal of medical and biological research*, 37, 11, 1669-1671.

Carretto E, Barbarini D, Locatelli F, Giraldi E, Pellegrini N, Perversi L, Grossi P, Marone P, Bonetti F (2000). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection

in three children given allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical and microbiologic features. *Haematologica*, 85, 11, 1158-1164.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1993). Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 42, 597-599.

Centers for Disease Control and Prevention's Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) special report. (1995). Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 16, 105-113.

Chadwick PR, Oppenheim BA, Fox A, Woodford N, Morgenstern GR, Scarffe JH (1996). Epidemiology of an outbreak due to glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* on a leukaemia unit. *Journal of Hospital Infection*, 34, 3, 171-182.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Rainer JE, Nguyen PN, Thomas C (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16, 23, 11141-11156.

Charles MAP, Franz AB, Silberhorn M, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel HW (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4385-4389.

Chiew YF, Hall LMC (1998). Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycoside resistances. *Journal of Hospital Infection*, 38, 223-230.

Chingwaru W, Mpuchane SF, Gashe BA (2003). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. *Journal of Food Protection*, 66, 6, 931-936.

Chou YY, Lin TY, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY (2008). Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 41, 124-129.

Chow JW, (2000). Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 2, 586-589.

CLSI (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first edition: Informational Supplement. CLSI document M100-S21. CLSI. Wayne, PA, USA.

Cockerill FR (1999). Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 2, 199-212.

Courvalin P (2006). Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 1, 25-34.

Cox CR, Coburn PS, Gilmore MS (2005). Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Current Protein and Peptide Science*, 6, 77-84.

Çelik S (2001). Hayvan kökenli enterokok suşlarının virulens faktörleri. Doktora tezi. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.

Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 686-707.

Çöleri A, Çökmüş C (2008). Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65, 2, 87-96.

D'Agatai EMC, Gerrits MM, Tang YW, Samore M, Kusters JG (2001). Comparison of pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22, 550-554.

Danielle MZ, Garrison MM, Allpress AL, Heath J, Christakis DA (2005). Infection control policies and hospital-associated infections among surgical patients: variability and associations in a multicenter pediatric setting. *Pediatrics*, 115, 387-397.

- Day AM, Sandoe JAT, Cove JH, Phillips-Jones MK (2001). Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 392-396.
- De Jong A, Bywater R, Butty P, Deroover E, Godinho K, Klein U, Wheadon A (2009). A pan-European survey of antimicrobial susceptibility towards human-use antimicrobial drugs among zoonotic and commensal enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, 4, 733-744.
- De Leener E, Martel A, De Graef EM, Top J, Butaye P, Haesebrouck F, Willems R, Decostere A (2005). Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their *erm* (B) genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5, 2766-2770.
- Dendle C, Ballard SA, Grabsch EA, Gao W, Grayson ML (2009). Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* containing both *vanA* and *vanB* gene clusters. *Journal of Hospital Infection*, 71, 4, 379-381.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P (2004). Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42, 12, 5857-5860.
- Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN (2007). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance proGram. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58, 2, 163-170.
- Devriese LA, Homme J, Wijnfels R, Haesebrouck F (1991). Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 1, 46-50.
- Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Homme J, Haesebrouck F (1996). Presence of Vancomycin-Resistant Enterococci in farm and pet animals. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 40, 10, 2285-2287.

Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele M, Van Landuyt HW, Gordts B, Butaye P, Swings J, Haesebrouck F (2002). Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 821-827.

Devriese L, Baele M, Butaye P (2006). The genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*, 4, 163-174.

Dilik Z, İstanbulluoğlu E (2010). Entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerindeki hayvanlardan izole edilen enterokokların fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 32, 46, 37-46.

Doğanay V, Kizirgil A (2007). Kinopristin/Dalfopristin ve diğer sekiz antimikrobiyal ajanın Gram pozitif koklar üzerine in vitro etkinliği. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 21, 3, 129-132.

Doğru AK, Gençay YE, Ayaz ND (2010a). Comparison of virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* chicken neck skin and faeces isolates. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16, 129-133.

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.

Domig JK, Mayer HK, Kneifel W (2003). Methods used for the isolation, enumeration characterisation and identification of *Enterococcus spp.*2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 165-188.

Donabedian SM, Chow JW, Boyce JM, McCabe RE, Markowitz SM, Coudron PE, Zervos MJ (1992). Molecular typing of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium* isolates from diverse geographic areas. *Journal of clinical microbiology*. 30, 11, 2757-2761.

- Donabedian SM, Perri MB, Abdujamilova N, Gordoncillo M J, Naqvi A, Reyes KC, Bartlett P (2010). Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan counties. *Journal of clinical microbiology*, 48,11, 4156-4160.
- Duim B, Wassenaar TM, Rigter A, Wagenaar J (1999). High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 6, 2369-2375.
- Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P (1994). Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38, 7, 1675-1677.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 24-27.
- Eaton TJ, Gasson MJ (2001). Molecular screening of enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67, 4, 1628-1635.
- Emborg HD, Andersen JS, Seyfarth AM, Wegener HC (2003). Relations between the consumption of antimicrobial growth promoters and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* isolated from broilers. *Epidemiology and Infection*, 132, 95-105.
- Fabretti F, Huebner J (2005). Implant infections due to enterococci: role of capsular polysaccharides and biofilm. *The International Journal of Artificial Organs*, 28, 1079-1090.
- Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, 74, 4164-4171.

Facklam RR, Collins MD (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of clinical microbiology*, 27, 4, 731-734.

Facklam RR, Teixeira LM (1998). *Enterococcus*. In: Collier, L., Bolows, A., Sussman (eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Vol 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edward Arnold, 9th edition. London, 669-682.

Feizabadi MM, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzadeh A, Asadi S, Etemadi G (2003). Phenotypic characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000–2001. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 645–649.

Fisher K, Phillips C (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749-1757.

Foy CA, Parkes HC (2001). Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 47, 6, 990-1000.

Fracalanza SAP, Scheidegger EMD, Santos PFD, Leite PC, Teixeira LM (2007). Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 7, 853-859.

Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L (2002). *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *Journal of Bacteriology*, 184, 6351-6356.

French GL (1998). Enterococci and vancomycin resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 27, 75-83.

Fortina MG, Ricci G, Mora D, Manachini PL (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1717-1721.

Frye JG, Jackson CR (2013). Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from US food animals. *Frontiers in Microbiology*, 4, 135.

- Garcia-Migura L, Pleydell E, Barnes S, Davies RH, Liebana E (2005). Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from and broyler poultry and pig farms in England and Wales. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 7, 3283-3289.
- Garrigus WP (2007). Poultry Farming. Encyclopædia Britannica.
- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferrero CA, Persing DH (1994). Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 7, 1768-1772.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6, 10, 995-1001.
- Goering RV (2000). The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Reviews in Medical Microbiology*, 11, 3, 145-152.
- Gonçalves A, Igrejas G, Radhouani H, Santos T, Monteiro R, Pacheco R, Alcaide E, Zorrilla I, Serra R, Torres C, Poeta P (2013). Detection of antibiotic resistant enterococci and *Escherichia coli* in free range Iberian Lynx (*Lynx pardinus*). *Science of the Total Environment*, 456, 115-119.
- Gordon MH (1905). A ready method of differentiating *Streptococci* and some results already obtained by its application. *The Lancet*, 166, 4289, 1400-1403.
- Graham NC, Bartley EO (1939). Some observations on the classification of enterococci. *Journal of Hygiene*, 39, 538-552.
- Gu L, Cao B, Liu Y, Guo P, Song S, Li R, Dai H, Wang C (2009). A new *Tn1546* type of VanB phenotype–*vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63, 1, 70-75.
- Gülhan T, Aksakal A, Ekin IH, Savaşan S, Boynukara B (2007). Virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from humans and pets. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 5, 477-482.
- Gülhan T, Boynukara B, Durmus A, Kiziroglu I, Sancak YC (2012). Enteric bacteria and some pathogenic properties of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and

*Escherichia coli* strains isolated from wild ducks and gulls. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21, 7, 1961-1966.

Haas W, Shepard BD, Gilmore MS (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing. *Nature*. 415, 84-87.

Hammerum AM, Fussing V, Aarestrup FM, Wegener HC (2000). Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 677-680.

Handwerger S, Raucher B, Altarac D, Monka J, Marchione S, Singh KV, Walters B (1993). Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clinical Infectious Diseases*, 16, 6, 750-755.

Hayden MK, Trenholme GM, Schultz JE, Sahm DF (1993). In vivo development of teicoplanin resistance in VanB *Enterococcus faecium* isolate. *The Journal of Infectious Diseases*, 167, 1224-1227.

Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, White DG (2003). Prevalance and antimicrobial resistance of enterococcus species isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 12, 7153-7160.

Hayes JR, English LL, Carr LE, Wagner DD, Joseph SW (2004). Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus spp.* isolated from commercial poultry production environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 10, 6005-6011.

Heaton MP, Discotto LF, Pucci MJ, Handwerger S (1996). Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. *Gene*, 171, 1, 9-17.

Heshberger E, Oprea SF, Donabedian SM, Perri M, Bozigar P, Bartlett P, Zervos MJ (2005). Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 127-130.

Heuer OE, Pedersen K, Jensen LB, Madsen M, Olsen JE (2002). Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban. *Microbial Drug Resistance*, 8, 4, 355-361.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection control and hospital epidemiology*, 29,11, 996-1011.

Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A (2009). Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza city. *Journal of Public Health* 17, 243-249.

Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, van Embden JDA, Willems RJL (2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1963-1971.

Houston AC (1899). Bacterioscopic examinations of drinking water, with particular reference to the relation of *Streptococci* and *Staphylococci* with waters of this class. *Suppl. to 28th Am. Rep. Local Government Containing Rep. Med. Officer for 1898-1899*, 467.

Hsieh SR (2000). Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. *Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi*. 33, 4, 253-257.

Huckabee CM, Huskins WC, Murray PR (2009). Predicting clearance of colonization with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by use of weekly surveillance cultures. *Journal Of Clinical Microbiology*, 47, 1229-1230.

Hufnagel M, Carey VJ, Baldassarri L, Reinert RR, Huebner J (2006). Distribution of four capsular serotypes of *Enterococcus faecalis* among clinical isolates from different geographical origins and infection sites. *Infection*, 34, 22-25.

Ike Y, Tanimoto K, Ozawa Y, Nomura T, Fujimoto S, Tomita H (1999). Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *The Lancet*, 353, 9167, 1854.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Ladely SR (2004). Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian diseases*, 48, 1, 100-107.

Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, Oliver KA, Chan MS, Kunst F, Glaser P, Rusniok C, Crook DWM, Harding RM, Bisharat N, Spratt BG (2003). Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 6, 2530-2536.

Joseph WC (2000). Aminoglycosid resistance in enterococci. *Clinical Infectious Disease*, 31, 586-589.

Joseph SW, Hayes JR, English LL, Carr LE, Wagner DD (2001). Implications of multiple antimicrobial-resistant enterococci associated with the poultry environment. *Food Additives & Contaminants*, 18, 12, 1118-1123.

Junco MTT, Rodriguez OA, Barrasa JLM, Martin MG (2005). Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from poultry faeces. *Research in Veterinary Science*, 78, 33-38.

Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, Willems RJL (2003). Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41, 2330-2336.

Kandler O, Schleifer KH, Dandl R (1968). Differentiation of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder and *Streptococcus faecium* Orla-Jensen based on the amino acid composition of their murein. *Journal of bacteriology*, 96, 6, 1935-1939.

Kariyama R, Mitsuata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H (2000). Simple and reliable Multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 8, 3092-3095.

Kaukas A, Hinton M, Linton AH (1986). Changes in the faecal enterococcal population of young chickens and its effect on the incidence of resistance to certain antibiotics. *Letters in applied microbiology*, 2, 1, 5-8.

- Kaya S, Çetin ES, Arıkan S, Tetik T, Kesbiç H, Yaşar S (2007). Tavuklardan izole edilen *E. coli*, *klebsiella* ve *enterokoklarda* antibiyotik duyarlılık durumları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 14, 2, 24-27.
- Kayaoğlu G, Orstavik D (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15, 308-320.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 11, 3497-3503.
- Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia CE (2005). Molecular characterization of multi-resistant *Enterococcus spp.* from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 27-34.
- Kim M, Lee S, Lim J, Seo KS, Kim Y, Han K, Choi JH, Yoo JH, Choi SM, Shin WS, Lee DG, Kim KM (2003). Rectal surveillance culture of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients at hematology-oncology unit. *Infection and Chemotherapy*, 35, 123-129.
- Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG (2010). Bacterial flagellin stimulates toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 201, 534-543.
- Kirk M, Hill RLR, Casewell MW, Beighton D (1997). Isolation of vancomycin-resistant enterococci from supermarket poultry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 418, 289-291.
- Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W (1995). VanA-mediated high level-glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiology Letters*, 125, 165-172.

- 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, 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 and Environmental Microbiology*, 64, 5, 1825-1830.
- Kolář M, Pantůček R, Bardoň J, Vágnerová I, Typovska H, Válka I, Doškař J (2002). Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Veterinarni Medicina Czech*, 47, 52-59.
- Kolbert CP, Persing DH (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 3, 299-305.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM (1997). The Gram Positive Cocci, Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria. 577-629. In: Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Mikrobiology, 5th Ed., Philadelphia. Lippincott.
- Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, Andrighetto C, Torriani S (2001). Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *dll* genes. *Journal of Microbiological Methods*, 47, 35-40.
- Krieger JN, Kaiser DL, Werzel RP (1983). Urinary root etiology of bloodstream infection in hospitalize patient. *The Journal of Infectious Diseases*, 148, 57-62.
- Lauderdale TL, Shiau YR, Wang HY, Lai JF, Huang IW, Chen PC, Chen HY, Lai SS, Liu YF, Ho M (2007). Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. *Environmental Microbiology*, 9, 3, 819-823.
- Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, Willems R J (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of bacteriology*, 186, 3, 672-682.

- Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V (2011). D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 10, 4606-4612.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine*, 319, 157-161.
- Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P (1989). Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33, 1, 10-15.
- Lemcke R, Bülte M (2000). Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 185-194.
- Leme IL, Ferreira AJP, Bottino JA, Pignatari ACC (2000). Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 1, 53-57.
- Lewis CM, Zervos MJ (1990). Clinical manifestations of enterococcal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9, 2, 111-117.
- Lim SK, Tanimoto K, Tomita H, Ike Y (2006). Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 10, 6544-6553.
- Lopez M, Saenz Y, Martinez MJA, Marco F, Robredo B, Bezares BR, Larrea FR, Zarazaga M, Torres C (2010). *Tn1546* structures and multilocus sequence typing of *vanA*-containing enterococci of animal, human and food origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1570-1575.
- Lucet JC, Armand-Lefevre L, Laurichesse JJ, Macrez A, Papy E, Ruimy R, Deblangy C, Lozach A, Lolom I, Jarlier V, Andreumont A, Leport C (2007). Rapid control of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a French university hospital. *Journal of Hospital Infection*, 67, 1, 42-48.

Lukášová J, Šustáčková A (2003). Enterococci and antibiotic resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 72, 2, 315-323.

MacCallum W, Hastings T (1899). A case of acute endocarditis caused by micrococcus zymogenes (Nov. Spec.), with a description of the microorganism. *The Journal of Experimental Medicine*, 4, 521-534.

Mac K, Wichmann-Schauer H, Peters J, Ellerbroek L (2003). Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 2, 305-309.

Mallon DJ, Corkill JE, Hazel SM, Wilson JS, French NP, Bennett M, Hart CA (2002). Excretion of vancomycin-resistant enterococci by wild mammals. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 6, 636-638.

Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA (2007). Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Medical Journal of Australia*, 186, 454-457.

Mannu L, Paba A, Pes M, Floris R, Scintu MF, Morelli L (1999). Strain typing among enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo cheese. *FEMS microbiology letters*. 170, 1, 25-30.

Manson JM, Smith JMB, Cook GM (2004). Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broylers after discontinuation of avoparcin use. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 10, 5764-5768.

Marothi YA, Agrihotri H, Dubey D (2005). Enterococcal resistance - an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23, 214-219.

Martin BS, Campos L, Bravo V, Adasne M, Borie C (2005). Evaluation of antimicrobial resistance using indicator bacteria isolated from pigs and poultry in Chile. *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3, 171-178.

Martone WJ (1998). Spread of vancomycin-resistant enterococci: Why did it happen in the United States. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19, 539-545.

McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR (1997). Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 311-317.

McNamee PT, King DC (1996). Endocarditis in broiler breeder rearers due to *Enterococcus hirae*. *The Veterinary Record*, 138, 10, 240-240.

Miele A, Bandera M, Goldstein BP (1995). Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in enterococci and to study gene organization in VanA isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39, 8, 1772-1778.

Moellering RC (1982). Enterococcal infections in patients treated with moxalactam. *Review of Infectious Diseases*. 4, 3, 708-711.

Moellering RC, Wennersten C (1983). Therapeutic potential of rifampin in enterococcal infections. *Review of Infectious Diseases*, 5, 3, 528-532.

Molitoris E, Krichevsky MI, Fagerberg DJ, Quarles CL (1986). Effects of dietary chlortetracycline on the antimicrobial resistance of porcine faecal streptococcaceae. *Journal of applied bacteriology*, 60, 2, 111-120.

Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, Alfa M (2001). Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 10, 3481-3485.

Murray BE, Singh KV, Ross RP, Don Heath J, Dunne GM, Weinstock MG (1993). Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function. *Journal of Bacteriology*, 175, 5216-5223.

Murray BE (1997). Vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Medicine*, 101, 284-293.

Murray BE (1998). Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases*. 4, 37-47.

Myers TW, Gelfand DH (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 30, 31, 7661-7666.

Nam S, Kim MJ, Park C, Park JG, Maeng PJ, Lee GC (2013). Detection and genotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. by multiplex polymerase chain reaction in Korean aquatic environmental samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216, 421-427.

Nakayama J, Tanaka E, Kariyama R, Nagata K, Nishiguchi K, Mitsuhashi R, Sonomoto K (2007). Siamycin attenuates fsr quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 189, 4, 1358-1365.

Nilsson O, Greko C, Bengtsson B, Englund S (2012). Genetic diversity among VRE isolates from Swedish broilers with the coincidental finding of transferrable decreased susceptibility to narasin. *Journal of applied microbiology*, 112, 4, 716-722.

Ongut G, Kilinckaya H, Baysan BO, Ogunc D, Colak D, Inan D, Gunseren F (2013). Evaluation of Brilliance VRE agar for the detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens. *Journal of medical microbiology*, 62, 4, 661-662.

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.

Park YJ, Oh EJ, Kim BK, Kim SM, Shim SI (1999). Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E. faecium* polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 34, 269-273.

Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR (1997). Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC2/3* genes in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3, 703-707.

Perandin F, Manca N, Galati L, Piccolo G, Calderaro A, Viani I, Ricci L, Dettori G, Chezzi C, Turano A (2001). Usefulness of genus-specific PCR and Southern blot

species-specific hybridization for the detection of imported malaria cases in Italy. *The New Microbiologica*, 24, 1, 69-76.

Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F (2002). A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42, 4, 273-277.

Perrins C (2003). Firefly Encyclopedia of Birds, Ed. Perrins C, N.Y, Firefly Books, Ltd.

Piatak JrM, Luk KC, Williams BLJD, Lifson JD (1993). Quantitative competitive polymerase chain reaction for accurate quantitation of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques*, 14, 1, 70-81.

Piddock LJV (1994). New quinolones and Gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38, 163-169.

Pitt TL, Saunders NA (2000). Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *Journal of Clinical Pathology*, 53, 1, 71-75.

Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Agents*, 27, 131-137.

Poeta P, Costa D, Klibi N, Rodrigues J, Torres C (2006). Phenotypic and genotypic study of gelatinase and  $\beta$ -haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *J. Vet. Med., B*, 53, 203-208.

Poeta P, Igrejas G, Costa D, Sargo R, Rodrigues J, Torres R (2008). Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 385-392.

Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P (2000). Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 415-418.

Price CS, Huynh H, Paule S, Hollis RJ, Noskin GA, Pfaller MA, Peterson LR (2002). Comparison of an automated ribotyping system to restriction endonuclease analysis

and pulsed-field gel electrophoresis for differentiating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1858-1861.

Quednau M, Ahrne S, Petersson AC, Molin G (1998). Antibiotics-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1163-1770.

Radhouani H, Pinto L, Coelho C, Sargo R, Araujo C, Lopez M, Torres C, Igrejas G, Poeta P (2010). MLST and a genetic study of antibiotic resistance and virulence factors in *vanA*-containing *Enterococcus* from buzzards (*Buteo buteo*). *The Society for Applied Microbiology*, 50, 537-541.

Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Pacheco R, Monteiro R, Sargo R, Brito F, Torres C, Poeta P (2013). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and enterococci from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe*, 23, 82-86.

Radu S, Toosa H, Rahim RA, Reezal A, Ahmad M, Hamid AN, Rusul G, Nishibuchi M (2001). Occurrence of the *vanA* and *vanC2/3* genes in *Enterococcus* species isolated from poultry sources in Malaysia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 39, 145-153.

Rales M (2010). Chickens are omnivores: It's no dilemma. <http://www.westonaprice.org/health-topics/chickens-are-omnivores-its-no-dilemma>, Erişim Tarihi 06.06.2014.

Raponi G, Ghezzi MC, Gherardi G, Lorino G, Dicuonzo G (2010). Analysis of methods commonly used for glycopeptide and oxazolidinone susceptibility testing in *Enterococcus faecium* isolates. *Journal of medical microbiology*, 59, 6, 672-678.

Reynolds PE, Courvalin P (2005). Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 49, 21-25.

Roberts TC, Storch GA (1997). Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1, 268-269.

- Rodrigues J, Poeta P, Martins A, Costa D (2002). The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin. *Journal of Veterinary Medicine B*, 49, 278-280.
- Sabol K, Patterson JE, Lewis JS (2005). Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1664-1665.
- Santos T, Silva N, Igrejas G, Rodrigues P, Micael J, Rodrigues T, Resendes R, Gonçalves A, Marinho C, Gonçalves D, Cunha R, Poeta P (2013). Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*, 24, 25-31.
- Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC (1997). Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 35, 9, 2325-2330.
- Savor C, Pfaller MA, Kruszynski JA, Hollis RJ, Noskin GA, Peterson LR (1998). Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiologic data. *Journal of clinical microbiology*, 36, 11, 3327-3331.
- Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, Johnson JA, Johnson RJ, Farness KM, Holloway WJ, Steele-Moore L (1996). In vitro activity of LY333328, an investigational glycopeptide antibiotic, against enterococci and staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2416–2419.
- Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JAA (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43, 10, 2542-2546.
- Sedgley C M, Lennan SL, Clewell DB (2004). Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral microbiology and immunology*, 19, 2, 95-101.
- Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlen G (2005). Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus spp.* *Oral Microbiology Immunology*, 20, 10-19.

- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, 67, 1, 193-200.
- Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS (2002). Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, 417, 6890, 746-750.
- Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M (2004). Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 609-618.
- Shankar N, Baghdayan AS, Willems R, Hammerum AM, Jensen LB (2006). Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pigs in Denmark. *Journal of clinical microbiology*, 44, 11, 4200-4203.
- Shuford JA, Patel R (2005). Antimicrobial growth promoter use in livestock-implications for human health. *Reviews in Medical Microbiology*, 16, 1, 17-24.
- Sırıken B, Fındık A, İnat G, Çadırcı Ö, Kevek TO (2011). The investigation of prevalence, vancomycin resistance and slime factor production of enterococci isolated from chicken carcasses. *Etlik Vet. Mikrobiyoloji Dergisi*, 22, 54-60.
- Sillanpää J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE (2009). Distribution of genes encoding MSCRAMMs and Pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 896-901.
- Silva N, Igrejas G, Figueiredo N, Gonçalves A, Radhouani H, Rodrigues J, Patricia P (2010). Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Science of the Total Environment*, 408, 4871-4876.
- Singh KV, Weinstock GM, Murray BE (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46, 6, 1845-1850.

- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 512-530.
- Smith PF, Booker BM, Ogundele AB, Kelchin P (2005). Comparative in vitro activities of daptomycin, linezolid, and quinupristin/dalfopristin against Gram-positive bacterial isolates from a large cancer center. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 52, 3, 255-259.
- Son R, Nimita F, Rusul G, Nasreldin E, Samuel L, Nishibuchi M (1999). Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 118-122.
- Song JH, Ko KS, Oh WS, Park S, Heo ST, Kwon KT, Ryu SY, Peck KR, Lee NY (2006). High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates with VanB phenotype and *vanA* genotype in Korean hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56, 4, 401-406.
- Spelman DW (2002). Hospital-acquired infections. *MJA Practice Essentials*, 176, 286-291.
- Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A (2005). Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1575-1580.
- Steenjtes A, Veldman KT, Mevius DJ, Landman WJM (2002). Molecular epidemiology of unilateral amyloid arthropathy in broiler breeders associated with *Enterococcus faecalis*. *Avian Pathology*, 31, 1, 31-39.
- Struelens MJ, De Ryck R, Deplano A (2001). Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, 159-176.
- Struelens MJ, Denis O, Rodriguez-Villalobos H (2004). Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microbes and infection*, 6, 11, 1043-1048.

- Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1567-1574.
- Tacconelli E, Cataldo MA (2008). Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 99-106.
- Tambyah PA, Marx JA, Maki DG (2004). Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 1277-1281.
- Tang YW, Persing DH (1999). Molecular detection and identification of microorganisms. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, 215-244.
- Tankson JD, Thaxton JP, Vizzier-Thaxton Y (2001). Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity*, 69, 10, 6318-6322.
- Taşova Y, İnali AS (2004). Enterokok infeksiyonlarında klinik. Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. *BilimselTıp Yayınevi*, 17-22.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2622-2636.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N (2004). Enterococcal surface protein, esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 72, 6032-6039.
- Testa RT, Peterson PF, Jacobus NV, Sum P, Lee VJ, Tally F (1993). In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylcyclines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 2770-2777.
- Tomayko JF, Murray BE (1995). Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2903-2907.

- Torres C, Escobar S, Portillo A, Torres L, Rezusta A, Larrea F R, Revillo MJ, Aspiroz C, Zarazaga M (2006). Detection of clonally related *vanB2*- containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1237-1243.
- Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56, 7, 352-357.
- Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Deponte A, Stathopoulos C, Tsakris A, Pournaras S (2012). Difference in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microbial Pathogenesis*. 52, 336-343.
- Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL (2009). Review of virulence factors of *Enterococcus*: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27, 301-305.
- Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*; 1, 57-58.
- Ünal N, Dilik Z, Yıldırım M (2010). Isolation of a *vanA* positive *Enterococcus faecium* from commercial broiler farms in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 16, 1, 127-129.
- Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Füssing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 1-46.
- Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CMAP, Foulquié MMR, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel WH (2002). Intraspecies genoMIC groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1381-1391.

- Van den Bogaard AE, Stobberingh EE (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, 4, 327-335.
- Van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 6, 763-771.
- Van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, Stobberingh EE (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 497-505.
- Van den Braak N, van Belkum A, van Keulen M, Vliegthart J, Verbrugh HA, Endtz HP (1998). Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients and poultry products in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1927-1932.
- Van Horn KG, Rodney KM (1998). Colonization and microbiology of the motile enterococci in a patient population. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 31, 4, 525-530.
- Versteeg L (1997). Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* infections review of the literature. Chapter I.
- Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D (1999). Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *ANKEM Dergisi*, 13, 1-4.
- Wang CC, Siu LK, Chen MK, Yu YL, Lin FM, Ho M, Chu ML (2001). Use of automated riboprimer and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological studies of invasive *Haemophilus influenzae* in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 3, 277-283.
- Watts JL, Salmon SA, Yancey JrRJ, Nickerson SC, Weaver LJ, Holmberg C, Pankey JW, Fox LK (1995). Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary glands of dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 78, 7, 1637-1648.

Wegener HC, Madsen M, Nielsen N, Aarestrup FM (1997). Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. *International journal of food microbiology*. 35, 1, 57-66.

Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F (1999). Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerging infectious diseases*. 5, 3, 329.

Werner G, Coque TM, Hemmerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Jonshon A, Klare I, Kristinsson KG, Leclencq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, 13, 1-11.

Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G (2006) Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 6. baskı. 40-643.

Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP (2005). Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the *Pneumococcus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4, 3554-3557.

Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M (2010). vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54, 11, 4643-4647.

Weis JH, Eichwald E, Kolbert CP, Persing DH, Weis JJ (1994). Heritable susceptibility to severe *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis is dominant and is associated with persistence of large numbers of spirochetes in tissues. *Infection and Immunity*, 62, 2, 492-500.

Yang L, Weis JH, Eichwald E, Kolbert CP, Persing DH, Weis JJ (1994). Heritable susceptibility to severe *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis is dominant and is associated with persistence of large numbers of spirochetes in tissues. *Infection and Immunity*, 62, 2, 492-500.

- Yetkin A, Arıca NA, Tlek N, Yağcı S, Koruk ST (2004). Vankomisin dirençli enterokok bakteremisi: Olgu Sunumu. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 8, 310-314.
- Yıldırım, M. (2007). Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Dzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 46-52.
- Yoshimura H, Ishimaru M, Endoh YS, Suginaka M, Yamatani S (1998). Isolation of glycopeptide-resistant enterococci from chickens in Japan. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. 42, 12, 3333.
- Yoshimura H, Ishimaru M, Endoh YS, Kojima A (2000). Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broyler and layer chickens. *Letters in applied microbiology*. 31, 6, 427-432.
- Young KK, Resnick RM, Myers TW (1993). Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 4, 882-886.
- Zar JH (1999). Biostatistical Analysis, Fifth Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Zırakzadeh A, Patel R (2006). Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 81, 529-536.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Van'da 1985 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde lisans eğitimine 2004 yılında başladı. 2010 yılının Ocak ayında, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2010 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Doktora programını kazanarak Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki görevine devam etmektedir.