



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HİNDİ KUŞBAŞI ÖRNEKLERİNDE VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARIN VARLIĞI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

AZAM AZIMI MAHALLEH

GIDA HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr. MUAMMER GÖNCÜOĞLU

ANKARA
2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hindi kuşbaşı örneklerinde vankomisin dirençli enterokokların varlığı ve moleküler karakterizasyonu” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Azam AZIMI MAHALLEH

Tarih: 25.01.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalında

Azam Azımı MAHALLEH tarafından hazırlana
“Hindi kuşbaşı örneklerinde vankomisin dirençli enterokokların varlığı
ve moleküler karakterizasyonu ” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY
ÇOKLUĞU
ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25.01.2017

Prof. Dr. K. Serdar DİKER
Ankara Üni. Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet BAYSALLAR Prof. Dr. Muammer GÖNCÜOĞLU
SBÜ Gülhane Eğitim Araştırma Hastanesi Ankara Üni. Veteriner Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji

Prof. Dr. F. Seda BİLİR ORMANCI Doç. Dr. Naim Deniz AYAZ
Ankara Üni. Veteriner Fakültesi Kırıkkale Üni. Veteriner Fakültesi

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

Prof. Dr. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiv
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enterokokların Taksonomisi	2
1.2. Enterokokların Mikrobiyolojik Özellikleri	3
1.3. Enterokokların Virülens Faktörleri	4
1.3.1. Sitolizin	5
1.3.2. Agregasyon Faktörü (AF)	6
1.3.3. Jelatinaz (GelE)	7
1.3.4. Hyaluronidaz (HYL)	8
1.3.5. Ekstraselüler Süperoksit	8
1.3.6. Enterokokal Yüzey Proteini (ESP)	9
1.3.7. Lipoteikoik Asit (LTA)	10
1.3.8. Enterokokların Kollagenin Adhesiv Matriks Molekül Adezyonunu Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşeni (MSCRAMM)	11
1.3.9. Kapsül ve Hücre Duvarı Polisakkaritleri	11
1.3.10. Seks Feromonları	11
1.3.11. Biyofilm oluşumu	12
1.3.12. <i>Enterococcus faecalis</i> Antijen A Proteini (EfaA Proteini)	13

1.3.13. Antibiyotik Dirençlilik	13
1.3.13.1. İntrinsik direnç	16
1.3.13.1.1. β -laktam direnci	17
1.3.13.1.2. Düşük düzeyde aminoglikozid direnci	18
1.3.13.2. Kazanılmış direnç	18
1.3.13.2.1. Yüksek düzeyde β -laktam direnci	19
1.3.13.2.2. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci	19
1.3.13.2.3. Kloramfenikol direnci	20
1.3.13.2.4. Tetrasiklin direnci	20
1.3.13.2.5. Kinolon direnci	21
1.3.13.2.6. Makrolid, linkozamid ve B tipi streptogramin (MLSB) direnci	21
1.3.13.2.7. Oksazolidinon direnci	21
1.3.13.2.8. Glikopeptit direnci	21
1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	22
1.4.1. Plazmid	23
1.4.2. Transpozon	24
1.4.3. Bakterilerin Horizontal Gen Transferinde Rol Oynayan Mekanizmalar	24
1.4.3.1. Konjugasyon	24
1.4.3.2. Transformasyon	25
1.4.3.3. Transdüksiyon	25
1.4.4. Enzimatik İnhibisyon	26
1.4.5. Ribozomal Hedef Yerin Değişiklik	26
1.4.6. Aktif Pompa Sistemleri (Efluks Pompası)	27
1.4.7. İntegronlar	28
1.5. Vankomisin Dirençli Enterokoklar	30
1.6. Peptidoglikan Sentezinde Vankomisinin Rolü ve Direnç Mekanizması	33

1.7. Vankomisin Direncinin Regüle Olma Mekanizması	36
1.8. Vankomisin Direncinin Fenotipik Tanımlanması	37
1.8.1. Van A Tipi Direnç	37
1.8.2. Van B Tipi Direnç	38
1.8.3. Van C Tipi Direnç	39
1.8.4. Van D Tipi Direnç	40
1.8.5. Van E Tipi Direnç	41
1.8.6. Van G Tipi Direnç	41
1.9. Enterokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar	42
1.9.1. Gastrointestinal İnfeksiyonlar	43
1.10. Enterokokların Gıdalarda Bulunuşu	45
1.10.1. Et Ürünlerinde Enterokokların Varlığı	47
2. GEREÇ VE YÖNTEM	51
2.1. Gereç	51
2.1.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri ve Diğer Kimyasallar	51
2.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su	51
2.1.1.2. Slanetz–Bartley Agar	52
2.1.1.3. % 0.6 Maya Ekstraktı İçeren Tryptone Soya Agar	52
2.1.2. <i>Enterococcus</i> spp. İdentifikasyonu Amacıyla Kullanılan Besiyerler ve Kimyasal Maddeler	53
2.1.2.1. Brain Heart Infusion Broth	53
2.1.2.2. % 30'luk Hidrojen Peroksit	54
2.1.2.3. % 6.5'luk NaCl içeren MRS Agar (pH'sı 9.6)	54
2.1.2.4. SIM Medium	55
2.1.2.5. Bile Esculin Agar	56
2.1.2.6. Moeller Decarboxylase Broth Base	56

2.1.2.7. Phenol Red Broth Base ve Şekerleri	57
2.1.3. <i>Enterococcus</i> spp. İzolatlarının PCR Analizi Amacıyla Kullanılan Kimyasallar	58
2.1.3.1. <i>Taq</i> DNA Polymerase Set	58
2.1.3.2. dNTP Set	58
2.1.3.3. DNA Ladder ve Yükleme Solüsyonu	58
2.1.3.4. Primerler	58
2.1.3.5. TBE Solüsyonu (Tris-Boric acid-EDTA)	59
2.1.3.6. Ethidium Bromide (% 0.1'lik)	59
2.1.3.7. Agaroz Jel	59
2.1.4. <i>Enterococcus</i> spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotik Diskleri	60
2.1.4.1. Mueller-Hinton Agar	60
2.1.4.2. Antibiyotik Diskleri	60
2.2. Yöntem	61
2.2.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu	61
2.2.2. Biyokimyasal Reaksiyonlar	62
2.2.2.1. Katalaz Reaksiyonu	62
2.2.2.2. Motilite Reaksiyonu	63
2.2.2.3. L- pirolidonil- β -naftilamid Reaksiyonu	64
2.2.2.4. Eskülin Fermentasyonu	65
2.2.2.5. Arjinin Dekarboksilasyon Reaksiyonu	66
2.2.2.6. Pigmentasyon Reaksiyonu	66
2.2.2.7. Karbonhidrat Fermentasyon Reaksiyonlar	66
2.2.3. PCR Analizi ile Enterokokların Doğrulanması	69
2.2.4. Multipleks PCR ile <i>Enterococcus</i> spp. İdentifikasyonu	70
2.2.5. Antibiyotik Direnç Profillerinin Saptanması için Disk Difüzyon Yöntemi	71

2.2.6. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> İzolatlarında Multipleks PCR ile <i>van A</i> ve <i>van B</i> Genlerinin Belirlenmesi	72
2.2.7. Vankomisin'in İzolatlara Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi için E-Test Yöntemi	73
3. BULGULAR	74
3.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu	74
3.2. PCR Analizi ile Enterokokların Doğrulanması	76
3.3. Multipleks PCR ile <i>Enterococcus</i> spp. İdentifikasyonu	77
3.4. Disk Difüzyon Yöntemi ile Enterokokların Antibiyotik Direnç Profillerinin	78
3.5. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> İzolatlarında Multipleks PCR İle <i>Van A</i> ve <i>Van B</i> Genlerinin Belirlenmesi	89
3.6. Vankomisin'in İzolatlara Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi için E Test Yöntemi	98
4. TARTIŞMA	102
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	117
ÖZET	119
SUMMARY	120
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ	134

ÖNSÖZ

Dünyada artan antibiyotik direnci, antibiyotiklerin yaygın olarak ve çoğu zaman hatalı kullanılmaları sonucunda ortaya çıkan halk sağlığını tehdit eden önemli bir problemdir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) tarafından yayınlanan 2013 yılı verilerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yılda en az “2” milyon kişi antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalarla infekte olmakta ve en az “23,000” kişi bu infeksiyonlar sonucu hayatını kaybetmektedir.

ABD’de yılda 66,000 *Enterococcus* spp. infeksiyonunun gerçekleştiği, bunların 20,000’inin vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) tarafından oluşturulduğu ve bu infeksiyonların yaklaşık 1,300 kişinin ölümüne neden olduğu belirtilmektedir. İnfeksiyonlara neden olan *Enterococcus* serotiplerinin çoğunluğunu *E. faecalis* ve *E. faecium*’un oluşturduğu bildirilmektedir.

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

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

Simgeler ve Kısaltmalar

ABC	ATP-Binding Cassette
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AF	Agregasyon Faktör
AG	Aminoglikozidler
AGR	Aksesuar Gen Regulator
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu)
ATP	Adenozin Trifosfat
BHI	Brain Heart Infusion
BL	β -lactams
C	Kloramfenikol
CI	Siprofloksasin
CL	Klindamisin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamisin
D-Ala	D-alanine
D-Lac	D-laktat
D-Ser	D-serin
D-Ala-D-Ala	D-Alanil-D-Alanin
E	Eritromisin
EfaA Proteinini	<i>Enterococcus faecalis</i> Antijen A Proteinini
Eh	Oksidasyon Redüksiyon
ESP	Enterococcal Surface Protein (Enterokok Yüzey Proteinini)
FQ	Florokinolon

GeIE	Jelatinaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HAI	Health Care-associated Infections (Nozokomiyal İnfeksiyonlar)
HYL	Hyaluronidaz
IL1-β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
I*	Intermediate Resistance (Orta Düzeyde Dirençli)
IV	İntravenöz
ICE	Integrative Conjugative Elements (Bütünleştirici Konjüгатif Elementler)
IME	Integrative Mobilizable Elements (Bütünleştirici Hareketli Elementler)
LTA	Lipoteikoik Asit
LZD	Linezolid
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion
MFS	Major Facilitator Superfamily
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MIK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MLS _B	Makrolid, linkozamid ve B tipi streptogramin
ML	Makrolid
MMP	Matriks Metallo Proteinaz
MRS Agar	De Mann Rogosa Sharpe Agar
MSCRAMM	Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule Adhesin of Collagen from <i>Enterococci</i>

Adezyonunu	(Enterokokların Kollagenin Adhesiv Matriks Molekül Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşeni)
MTases	Metiltransferaz
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NB	Novobiyosin
OMP	Dış Membran Proteini
P	Penisilin 10 U (P-10)
PBP-5	Penisilin Bağlayan Protein 5
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincirleme Tepkimesi)
PGE-2	Prostaglandin E2
PMNL	Polimorfonükleer Lökositler
PYRase	Pyrolidonyl Arylamidase
PYR	L- pirolidonil- β -naftilamid
QD	Kinupristin/dalfopristin 15 μ g (QD-15)
R*	Resistant (Dirençli)
RI	Resistance Integrans (Direnç İntegronları)
RND	Resistance Nodulation Division
S*	Sensitive (Duyarlı)
S	Streptomisin
SI	Süper-integronları
SIM Medium	Citrate Indole Motility Medium
TC	Tetrasiklin
TI	Tigesiklin
TM	Trimetoprim
TMP-SMX sulfametoksazol)	Trimethoprim-sulfamethoxazole (Trimetoprim-

TSA	Tryptone Soya Agar
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha (Tümör Nekroz Faktörü)
VA	Vankomisin
VRE	Vancomycin Resistant <i>Enterococcus</i> (Vankomisine Dirençli Enterokoklar)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)



ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Slanetz–Bartley Agar’da tipik kırmızı, kestane ya da pembe renkli şüpheli entrokok koloniler 61
- Şekil 2.2.** PH’sı 9.6 olan ve % 6.5’luk NaCl içeren MRS Agar’a üreyen şüpheli entrokok koloniler 62
- Şekil 2.3.** Hareket negatif ve hareket pozitif koloniler SIM Medium agarda 63
- Şekil 2.4.** L- pirolidonil- β -naftilamid Reaksiyonunda (PYR), kırmızımtırak renk veren pozitif suşlar 64
- Şekil 2.5.** Bile Esculin Agarda siyah renk oluşturan pozitif suşlar 65
- Şekil 2.6.** Ekim yapılmış Moeller Decarboxylase Broth Base’lerin, 35⁰C’de en fazla 7 güne kadar inkübe edilmesi, pozitif suşlar besi yerini mavi mor renge ve negatif suşlar besi yerini sarı renge dönüştürülmesi 66
- Şekil 2.7.** Phenol Red Broth Base’e % 1’lik olacak şekilde karbohidratlar (mannitol, sorboz, riboz, sükröz) eklendi, şüpheli koloni karbohidratlı besiyerine süspanse edili, aerobik koşullar altında 37⁰C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı, besiyerinin sarı renge dönüşümü pozitif, rengin aynı kalması ise negatif olarak değerlendirildi 68
- Şekil.3.1.** PCR ile *tuf* geni tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: 100 bp DNA marker 2-3: *tuf* geni pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 4: Negatif kontrol 5: Pozitif kontrol) 76
- Şekil. 3.2.** Multipleks PCR ile *ddl_{E. faecalis}* ve *ddl_{E. faecium}* genleri tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol (*E. faecalis*) 3: Pozitif kontrol (*E. faecium*) 4: Negatif kontrol 5-6: *ddl_{E. faecalis}* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 7-8: *ddl_{E. faecium}* *E. faecium* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları) 77
- Şekil 3.3.** Disk difüzyon yöntemi ile izolatlarda belirlenen vankomisin (VA-30) direnci (A, a) ve (B, b) 81
- Şekil 3.4.** Disk difüzyon yöntemi ile belirlenen 5 antibiyotiğe birden dirençli (a, b, c, d, e), bir antibiyotiğe orat düzeyde dirençli (f), 2 antibiyotiğe birden duyarlı olduğu (g, h) bir izolat 83
- Şekil 3.5.** Multipleks PCR ile *van A* ve *van B* genleri tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol (*van*

A) 3: Pozitif kontrol (*van B*) 4: Negatif kontrol 5-6: *van A* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 7-8: *van B* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları) **89**

Şekil 3.6. İzolatlara ait E-test (1: MİK: 4 µg/ml, 2: MİK: 256 µg/ml üzeri) **98**

Şekil 3.7. İzolatlara ait A: E-test (MİK > 256 µg/ml), B: E-test (MİK = 4 µg/ml), C: E-test (MİK: 16 µg/ml), D: E-test (MİK < 0.015 µg/ml). **101**



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Enterokok türleri	3
Çizelge 1.2. Antibakteriyel maddelerin eksojen ve endojen direnç mekanizmaları	14
Çizelge 1.3. Bazı enterokok türlerinde eflux pompa sistemlerinin neden olduğu antibiyotik direnci verilmiştir	28
Çizelge 1.4. Çeşitli gıda örneklerinin enterokoklarla kontaminasyon oranları	49
Çizelge 2.1. <i>Enterococcus</i> spp. özellikleri	67
Çizelge 2.2. PCR analizlerinde kullanılan oligonükleotid primer çiftleri	71
Çizelge 2.3. Multipleks PCR’da kullanılan <i>van A</i> ve <i>van B</i> oligonükleotid primer çiftleri	73
Çizelge 3.1. Firmalara göre hindi kuşbaşı örneklerinde <i>Enterococcus</i> spp. izolasyonu	75
Çizelge 3.2. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	79
Çizelge 3.3. Antibiyotik direnç profillerine göre <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı	82
Çizelge 3.4. <i>Van A</i> ve <i>van B</i> pozitif veya negatif <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe dirençli oldukları gösterilmiştir	84
Çizelge 3.5. <i>Van A</i> ve <i>van B</i> pozitif veya negatif <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe orta düzeyde dirençli oldukları gösterilmiştir	85
Çizelge 3.6. <i>Van A</i> ve <i>van B</i> pozitif veya negatif <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe duyarlı oldukları gösterilmiştir	86
Çizelge 3.7. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının bir veya birden fazla antibiyotik direnç prfilleri	87
Çizelge 3.8. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının bir veya birden fazla antibiyotik orta düzey direnç prfilleri	88
Çizelge 3.9. <i>Van A</i> ve <i>van B</i> <i>Enterococcus</i> spp. izolatının firmalara göre dağılımı	90

Çizelge 3.10. Antibiyotiklere karşı dirençli <i>van A Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı	91
Çizelge 3.11. Antibiyotiklere karşı dirençli <i>van B Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı	92
Çizelge 3.12. <i>Van A</i> pozitif <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	92
Çizelge 3.13. <i>Van B</i> pozitif <i>E. faecalis</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	93
Çizelge 3.14. <i>Van B</i> pozitif <i>E. faecium</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	93
Çizelge 3.15. <i>Van B</i> pozitif <i>E. hirae</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. gallinarum</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	94
Çizelge 3.16. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ve MİK değerlerinin toplanan ay ve firmalara göre dağılım	95, 96, 97
Çizelge 3.17. <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının firmalara göre MİK değerleri	100
Çizelge 4.1. <i>E. faecalis</i> izolatlarının firmalara göre antibiyotik direnç profilleri	108
Çizelge 4.2. <i>E. faecium</i> izolatlarının firmalara göre antibiyotik direnç profilleri	110
Çizelge 4.3. <i>E. gallinarum</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> ve <i>E. casseliflavus</i> izolatlarının firmalara göre antibiyotik direnç profilleri	111

1. GİRİŞ

Enterokoklar, insanların üriner ve gastrointestinal, hayvanların ise gastrointestinal kanalında aynı zamanda çevre koşullarına dayanıklı olduklarından toprak, su ve bitkilerde bulunabilmektedirler. İnsan bağırsağında enterokok türleri içinde *E. faecalis* ve *E. faecium* baskın türler olmasının yanında endokarditis, bakteriyemi, solunum, üriner ve merkezi sinir sistem infeksiyonlarına neden olan patojenler olarak da bilinmektedirler (Petsaris ve ark., 2005; Vankerckhoven ve ark., 2008).

Etin kimyasal yapısı mikroorganizmaların kolaylıkla üreyebilmesi için uygun olmasından dolayı gıda güvenliği açısından risk oluşturabilmektedir. Etin patojen mikroorganizmalar ile kontaminasyonunda ve çoğalabilmesinde sıcaklık, oksijen varlığı, su aktivitesi, mikroorganizma türü ve sayısı oldukça önemlidir. Bu durum hem gıda kaynaklı infeksiyonlarda hem de etlerin bozulmasında büyük önem taşımaktadır. Enterokokların sıcaklık, pH ve tuza olan direnci işlem görmüş gıdalarda kolaylıkla bozulmaya sebebiyet verebilmektedir. Söz konusu mikroorganizmalarla kontamine hayvansal gıdalar yeterli ısı işlemi görmediklerinde insan gastrointestinal sisteminde infeksiyon oluşturabilmektedir (Kročko ve ark., 2007). Enterokokların ısıya olan direnci; bakteri kültürünün özellikleri, ortamın pH ve kompozisyonu gibi bir çok faktöre bağlıdır (Ahmad ve ark., 2002). Isıya olan direnci, membran yapısı ve yağ asidi konsantrasyonu ile ilişkilidir. Mikroorganizmaların gelişebildiği minimum sıcaklık derecelerinde membran yapısı stabildir (Ivanov ve ark., 1999). Yüksek sıcaklık derecelerinde ise membran yağ asidi konsantrasyonunun artması ve doymuş yağ asidi miktarının düşmesi, enterokokları yüksek sıcaklığa daha az dirençli hale getirmektedir. Aynı zamanda mikroorganizmaların büyüme eğrisindeki ortama uyum fazı (latent faz; lag faz) ve durgunluk fazlarında enterokokların ısıya olan direnci artmaktadır (Martinez ve ark., 2003). Bu mikroorganizmalar sıklıkla uygun olmayan çevre koşullarına maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle yaşam döngülerinin uzun bir bölümünü, ortamda büyüme için gerekli olabilecek substrat ve besin maddelerinin tükenmiş olduğu durgunluk fazında geçirmektedirler (Ahmad ve ark., 2002). Ayrıca enterokoklar dondurma ve donmuş muhafaza işlemlerine karşı relatif

dirençli olduğu için donmuş ürünlerde fekal indikatör olarak değerlendirilmektedir. Gıdalarda bozulmaya sebep olan enterokoklar çığ ette 10^2 - 10^4 kob/g kadar bulunmaktadır (Kročko ve ark., 2007). İnsan dışkısında ise *E. faecalis* 10^5 - 10^7 kob/g, *E. faecium* ise 10^4 - 10^5 kob/ g düzeyinde bulunduğu bildirilmektedir (Erol, 2007).

1.1. Enterokokların Taksonomisi

Enterokok cinsine ait mikroorganizmalar ilk olarak streptokoklar içerisinde “fekal orijinli streptokoklar” olarak gruplandırılmıştır. Enterokok terimi, ilk defa 1889’da Thiercelli tarafından, bakterinin bağırsak kaynaklı olduğunu belirtmek için kullanılmıştır. Andrewes ve Horder 1906’da *Streptococcus faecalis*’i, Orla-Jensen 1919’da *Streptococcus faecium*’u tanımlamıştır (Murray, 1990).

Sherman 1937 yılında streptokokları; enterokoklar (fekal streptokoklar), süt ürünleri streptokoklar (laktik asit streptokoklar), viridans grup ve piyogen streptokoklar olarak dört gruba ayırmıştır (Klein, 2003). Schleifer ve Klipper-Baltz ise 1984 yılında *S. faecalis* ve *S. faecium* türlerinin diğer streptokoklardan farklı oldukları nedeniyle *Enterococcus* genusu içerisinde incelenmeleri gerektiğini ifade etmişlerdir (Foulquié Moreno ve ark., 2006). Böylece önceleri, hücre duvarı antijen yapısına göre Lancefield tarafından D-grubu streptokoklar içinde gösterilen enterokokların, D-grubu streptokoklardan farklı olduğu kabul edilmiştir (Fisher ve Phillips, 2009).

Yapılan hücre protein profil analizi, DNA-DNA ve 16S rRNA hibridizasyon yöntemleriyle yeni enterokok türleri belirlenmeye başlanmıştır. Bu yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarda enterokok cinsi içerisinde günümüze kadar 34 tür bulunduğu gösterilmiştir (Çizelge 1.1), (Bilström, 2008).

Çizelge 1.1. Enterokok türleri (Bilström, 2008).

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

Ayrıca 16S rRNA sekans analizine göre farklı enterokok tür grupları oluşturulmuştur. Bu tür gruplar;

1. *E. faecium* grup: *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. villorum*
 2. *E. avium* grup: *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*
 3. *E. gallinarum* grup: *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*
 4. *E. dispar* grup: *E. asini*, *E. dispar*
 5. *E. saccharolyticus* grup: *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*
 6. *E. cecorum* grup: *E. cecorum*, *E. columbae*
 7. *E. faecalis* grup: *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*
- olarak sınıflandırılmaktadır (Franz ve ark., 2003).

1.2. Enterokokların Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterokoklar Gram pozitif, fakültatif anaerob, tekli, çift veya kısa zincirler oluşturabilen, % 6.5 NaCl'li ortamda, pH: 9.6'da ve 10-45°C arasında üreyebilen mikroorganizmalardır (Murray, 1990). Ancak *E. cecorum* ve *E. columbae* 10°C,

E. dispar, *E. sulfurous*, *E. malodoratus* ve *E. moraviensis* 45°C üreyemezler. *E. saccharominimus*, *E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. avium* ise NaCl'e duyarlıdır. Enterokokların çoğu 60°C de 30 dk. ısıtmaya dirençlidir (Foulquié Moreno ve ark., 2006).

Ayrıca safra tuzu varlığında esculini hidrolize edip Bile-Esculine (BE) agarda üreyebilmektedir. *E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* hariç pek çok enterokok türü, pyrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek pyrolidonyl-b-naftilamidi (PYR)'i hidrolize ederler. Bütün suşlar homofermentatiftir, gaz oluşturmazlar ve glukoz fermentasyonun son ürünü laktik asittir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* hariç, hareketsizdir (Domig ve ark., 2003). Sitokrom enzimi içermediklerinden katalaz aktiviteleri yoktur, ama bazı türler pseudo-katalaz aktivitesi sergileyebilmektedirler (Murray, 1998).

Enterokokların hemolizin aktiviteleri % 5'lik koyun kanı içeren Columbia Blood Agar'da değerlendirilmektedir. At ve insan kanlı agarda beta hemoliz yapabilmesine rağmen, koyun kanlı agarda alfa veya nonhemolitikdirler. *E. casseliflavus*, *E. flavesens* ve *E. mundtii* Tryptone Soya Agar'da sarı pigment oluşturabilmektedirler. Ayrıca *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* bakteriyosin (enterosin) üretebilmektedirler (Domig ve ark., 2003).

1.3. Enterokokların Virülens Faktörleri

Enterokoklar, sahip oldukları virülens özellikleri ile endokardit, bakteriyemi, menenjit ve neonatal infeksiyonların yanı sıra, solunum, üriner ve gastrointestinal sistem infeksiyonlarına, ayrıca intra-abdominal, yara ve yumuşak doku infeksiyonlarına da yol açmaktadırlar (Petsaris ve ark., 2005; Vankerckhoven ve ark., 2008).

Enterokokların virülensinde, genomda bulunan patojenite adaları ve plazmidlerde kodlanan virülens genleri rol oynamaktadır. Etkenin başlıca virülens faktörleri arasında; sitolizin, agregasyon faktörü (AF), jelatinaz (GeLE),

hiyalüronidaz (HYL), ekstraselüler süperoksit, enterokok yüzey proteini (ESP), lipoteikoik asit (LTA), enterokokların kollagenin adhesiv matriks molekül adezyonunu tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni (MSCRAMM), kapsül ve hücre duvarı polisakkaritler, seks feromonlar, biyofilm, *Enterococcus faecalis* antijen A proteini (EfaA Proteini) ve antibiyotik direnç yer almaktadır (Fisher ve Phillips, 2009).

Gıdalardan ve klinik izolatlardan elde edilen sonuçlara göre farklı enterokoklarda farklı virülens faktörlerin bulunabildiği bildirilmektedir. Genel olarak bakıldığında konak dokuya aderenz, invazyon, konak yangı tepkileri ve bakterinin potansiyel toksik ürünlerinin oluşmasının hastalık tablolarında temel oluşturduğu bildirilmektedir (Jett ve ark., 1994). Eaton ve Gasson'un (2001) gıdalardan izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının % 44'ünde ve klinik *E. faecalis* izolatlarının % 56'sında sitolizin aktivitesi gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, toplam 250 gıda kaynaklı enterokok izolatının; 127'si *E. faecalis*, 77'si *E. faecium*, 21'i *E. casseliflavus*, 19'ü *E. mundtii* ve 6'sı *E. durans* olduğu bildirilmiştir. Bu izolatların % 0.8'inde GelE, % 19'unda HYL, % 15'inde AF, % 28'inde ESP, % 2'sinde sitolizin ve % 22'sinde EfaA proteininin olduğu saptanmıştır (Trivedi ve ark., 2011).

1.3.1. Sitolizin

Önceleri hemolizin olarak tanımlanan sitolizin, çeşitli enterokok izolatlarında bulunabilen, insan, at ve tavşan eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren bir sitotoksik proteindir. Sitolizin eritrositler dışında, polimorfonükleer lökositler (PMNL), makrofajlar ve Gram pozitif organizmalara karşı da litik aktivite gösterebilmektedir. Bununla beraber toksinin; koyun eritrositler ve Gram negatif bakterilere karşı inaktif olduğu gösterilmiştir. Sitolizin'in aynı zamanda bir bakteriyosin olduğu ve bakteriyosininde bütün Gram pozitif organizmalar için bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Cox ve ark., 2005; Hällgren ve ark., 2009; Upadhyaya ve ark., 2009).

Sitolizin kodlayan gen bölgesi plazmid üzerinde ya da bakteriyel kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir. Sitolizin operonu *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, ve *cylI* olarak tanımlanan sekiz gen içerir. Gen analizleri sonucunda *cylL_L* genin, sitolizin kontrolünde önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. *CylR1* ve *cylR2* iki ayrı regülatör gendir ve sitolizin yapısal genlerinin transkripsiyonunu baskırlar. Sitolizin üretimi için bir quorum-sensing mekanizmanın olduğu bildirilmiştir (Haas ve ark., 2002; Cox ve ark., 2005).

Yapılan bir çalışmada sitolizin alt ünitleri olan *cylL_L* ve *cylL_S* genlerinin regülasyonunun, ortamın oksidasyon redüksiyon (Eh) potansiyeli ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada, düşük Eh potansiyeline sahip ortamlarda sitolizin üretiminin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca sitolizin operonu, sitolizin dışında *asa1* ve *esp* gibi diğer virülens genleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Day ve ark., 2003; Shankar ve ark., 2004).

1.3.2. Agregasyon Faktörü (AF)

Agregasyon faktör, plazmidlerdeki *asa1* geni tarafından kodlanan, bakteri yüzeyinde yer alan, protein yapıda bir adezindir (Hällgren ve ark., 2009). Entrokoklarda hücreler arasında sıkı teması sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda konjugasyon sırasında adezyonu arttırma, hücre-hücre temasını düzenleme, hücre dışı matriks proteinlerin adezyonla konak hücreye yapışma ve hücre yüzey hidrofobisitesini arttırma gibi özellikleri ile virülense katkıda bulunmaktadır (Mundy ve ark., 2000; Biavasco ve ark., 2007; Upadhyaya ve ark., 2009).

Agregasyon faktörü enterokoklara; nötrofiller, makrofajlar, bağırsak ve böbrek epitel hücreleri ve kalp kapaklarına bağlanma ve bu sayede endokardit ve üriner sistem infeksiyonu oluşturma yeteneğini sağlamaktadır (Koch ve ark., 2004).

AF'ye sahip olan enterokoklar, kompleman reseptörü yoluyla nötrofillere opsonizasyondan bağımsız olarak bağlanırlar. Bu tür bağlanma nötrofiller tarafından bakterinin inhibisyonunu engeller. Makrofajlar tarafından fagositozda ise; reaktif oksijen üretimi ile fagositik yıkıma karşı direnç gösteriler (Süßmuth ve ark., 2000).

Guzmán ve ark. (1991), tarafından yapılan bir çalışmada üriner sistem hastalardan izole edilen *E. faecalis*'lerin in vitro ortamda üriner sistem epitel hücrelerine yapıştığını göstermişlerdir. Bu yapışmadan, bakteri hücre duvarında bulunan AF gibi karbonhidrat antijenlerinin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir.

1.3.3. Jelatinaz (GelE)

Enterokoklar tarafından üretilen jelatinaz; jelatin, kollajen, fibrinojen, kazein, hemoglobin, insülini hidrolize edebilen, matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstra selüler çinko içeren bir üyesidir (Vergis ve ark., 2002; Biavasco ve ark., 2007; Upadhyaya ve ark., 2009). Jelatinazi kodlayan *gelE* geni kromozom üzerinde yer almaktadır. Jelatinaz ve serin proteaz, biyofilm oluşumu ve konak dokuların degradasyonu ile patogeneizde rol oynamaktadır (Fisher ve Phillips, 2009).

Jelatinaz üreten *E. faecalis* suşlarının akut toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve hayvan modellerinde endokardit oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretimini; stafilokokal aksesuar gen regülatör (AGR) bölgesinin bazı bölümlerine benzer dizi içeren, *fsr* bölgesini regüle etmektedir. Farklı klinik materyalden izole edilen *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretim oranlarının farklı olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada; 219 kan *E. faecalis* izolatının, 141'inde (% 64) jelatinaz üretiminin pozitif olduğu, bir başka çalışmada ise, 12 endokardit izolatının 12'sinde (% 100'ünde) ve 19 gaita izolatının 10'unda (% 53) *fsr* tespit edilmiştir (Upadhyaya ve ark., 2009). Vergis ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada ESP, hemolizin ve jelatinaz

aktivitesi ile yüksek düzey gentamisin direnci arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

1.3.4. Hyaluronidaz (HYL)

Hyaluronidaz, jelatinaz ve serin proteaz hidrolitik enzimler içerisinde yer almaktadır. Bu grup enzimler *Enterococcus* türülerinin virülensinde katkıda bulunmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009).

Streptokokların dışında stafilokoklar ve entokoklar gibi bazı gram pozitif bakterilerde bulunan hyaluronidaz enzimi, *hyl* geninde kodlanmaktadır (Vankerckhoven ve ark., 2004). Doğada sülük ve kancalı kurtlar gibi parazitler, zehirli yılanlar ve spermatozoa gibi memeli hücreleri tarafından da üretilmektedir. Hyaluronidaz, hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan bir enzimdir. Bağ dokudaki mukopolisakkaritlerin değişimlerine sebep olarak bakterinin yayılmasını sağlamaktadır. Ayrıca hyaluronik asidin degradasyon ürünü olan disakkaritler de bakteriler için besin kaynağı olabilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009).

1.3.5. Ekstraselüler Süperoksit

Süperoksit anyon, yüksek oranda bir reaktif oksijen radikalidir. İnflamatuar hastalıklarda hücre ve doku hasarına neden olmaktadır. Yağlar, proteinler, ve nükleik asitler gibi biyolojik bileşiklerde yıkıcı etkiye sahip olmaktadır. Nötrofil ve diğer fagositik hücrelerde süperoksit üretimi mikroorganizmaların inhibisyonu için gereklidir ve bu inflamasyonda doku hasarına yol açmaktadır (Kayaoglu ve Ørstavik., 2004).

Enterokoklar katalaz negatif olmalarına rağmen hidrojen peroksidin indirgenmesi için NADH peroksidazı eksprese etmektedirler. Aynı zamanda süperoksidi hidrojen perokside dönüştürmek için, süperoksit dismutaz enzimine

sahiptirler. Bu enzimler makrofajlar tarafından fagositoza maruz kalan enterokokların hayatta kalabilme kabiliyetlerini artırmaktadır (Jett ve ark., 1994).

NADH oksidazı kodlayan gen, *E. faecalis* genomunda bulunmaktadır. *E. faecalis* ekstraselüler süperoksit ve hidroksil radikalleri üretebilmektedir. Bu tür reaktif oksijenler ökaryotik hücrelerde, DNA hasarına neden olmaktadır (Szemes ve ark., 2010). Enterokokal bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik suşların gaita kökenli izolatıdan daha yüksek oranda süperoksit radikali ürettiği gösterilmiştir (Kayaoglu ve Ørstavik., 2004).

1.3.6. Enterokokal Yüzey Proteini (ESP)

Enterokokal yüzey proteini, ilk kez bir gentamisin dirençli *E. faecalis* MMH594 suşundan izole edilmiştir. Yüksek moleküler ağırlığa sahip ESP, 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geninde kodlanmaktadır. Bu gen konjugasyonla enterokok izolatları arasında aktarılabilmektedir (Tendolkar ve ark., 2004; Oancea ve ark., 2004).

ESP'yi kodlayan gen klinik izolatlarda yüksek oranda bulunurken, gaita kökenli izolatlarda nadiren bulunmaktadır (Vergis ve ark., 2002). Enterokokal yüzey proteinin iç kısmında; tekrarlayan birimlerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalma özelliği kazandıran bir bölge bulunmaktadır. ESP, N-terminal ucu ile hücre duvarına bağlanarak, bakterinin immün cevaptan kaçışını kolaylaştırmaktadır (Vankerckhoven ve ark., 2004). ESP'nin, üriner sistem infeksiyonlarında bir kolonizasyon faktör gibi *E. faecalis*'in mesane epiteline yapışmasını sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca biyofilm oluşumunu ve bakterinin bazı antibiyotiklere direnç göstermesini sağlamaktadır (Vergis ve ark., 2002; Vankerckhoven ve ark., 2004). ESP negatif *E. faecalis* suşlarının, *esp* genini plazmid transferi ile aldıktan sonra, biyofilm üretebildikleri bildirilmiştir. *Espfm* geni taşıyan *E. faecium* suşlarında, konjugasyon oranlarının yüksek olduğu ve ampisilin, siprofloksasin ve imipeneme yüksek düzeyde dirençli oldukları gösterilmiştir (Fisher ve Phillips, 2009).

1.3.7. Lipoteikoik Asit (LTA)

LTA, poligliserol fosfat ve fosfodiesterine bağlı, glikolipid içeren bir amfipatik moleküldür. Hücre duvarında olan LTA, enterokokların D grubu antijenini oluşturmaktadır (Jett ve ark., 1994). Bu molekülün lipit parçası; trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi pek çok ökaryotik hücreye bağlanabilmektedir (Kayaoglu ve Ørstavik., 2004). D-alanin lipoteikoik asit gibi yüzey molekülleri; Gram pozitif bakterilerde katyonik homeostazini sürdürmek ve otolitik faaliyetleri düzenlemek gibi çeşitli işlevler yapmaktadır (Fabretti ve ark., 2006).

E. faecalis suşlarında adezyon özelliği gösteren LTA'nın; donör hücre tarafından üretilen agregasyon faktörü için, alıcı hücrede reseptör olarak fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Bensing ve Dunny, 1993). Bu yüzden plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak *E. faecalis*'in virölensine katkıda bulunduğu düşünölmektedir (Jett ve ark., 1994).

E. faecalis ve diğer bazı Gram pozitif bakterilerde LTA'nın, bir immunomodölatör olarak PMNL'den; TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-8 ve PGE-2 gibi inflamatuvar mediyatörlerin, süperoksit radikallerin ve lizozomal enzimlerin salınımını artırdığı gösterilmiştir. *E. faecalis* suşlarından izole edilen LTA'nın, osteoblast, osteoklast, makrofaj ve nötrofillerde apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Kayaoglu ve Ørstavik., 2004). Yapılan bir çalışmada LTA'nın, biyofilm oluşumu ve antimikrobiyal peptidlere karşı direnç gelişimine sebep olduğu tespit edilmiştir (Fabretti ve ark., 2006).

1.3.8. Enterokokların Kollagenin Adhesiv Matriks Molekül Adezyonunu Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşeni (MSCRAMM)

Yapısal ve fonksiyonel olarak *S.aureus*'un kollajen bağlayan Cna proteinine benzer, özelliklere sahip bir adezindir. *E. faecalis*'lerde kollajen bağlayıcı adezin olarak tespit edilen Ace; enterokokal infeksiyonlarda, özellikle *E. faecalis* endokarditlerinde yaygın olarak eksprese edilmektedir. Klinik izolatlarda fekal izolatlardan daha yüksek oranda bulunmaktadır (Upadhyaya ve ark., 2009). *E. faecium*'larda, Acm bir kollajen bağlayıcı adezin olarak tespit edilmiştir. Acm, *S. aureus*'da bulunan Cna'ya % 62 oranında benzerlik gösterdiği ve *E. faecalis*'lerde kollajen bağlayan Ace ile homolog olduğu bildirilmiştir (Nallapareddy ve ark., 2003). MSCRAMM; *ebpAfm*, *ebpBfm*, *ebpCfm*, *scm*, *fms* genleri ile kodlanır (Sillanpää ve ark., 2009).

1.3.9. 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, enterokok infeksiyonlarının önlenmesinde etkili olmaktadır. Enterokoklarda hücre duvarı polisakkaritler; gliserol fosfat, glikoz ve galaktoz komponentlerinden oluşmaktadır. Antikorlar için hedef olan bu yapılar, immünite için hedef rolü oynamaktadırlar. Bu sebeple aşı oluşturmadaki önemleri araştırılmaktadır (Tendolkar ve ark., 2003). Bu polisakkaritler, *epa* gen kümesinde bulunan *orfde4* ve *orfde6* genler tarafından kodlanmaktadır (Xu ve ark., 2000).

1.3.10. Seks Feromonları

Seks feromonlar; *cpd*, *cob*, *ccf*, *cad* genlerinde kodlanan, 7-8 amino asit uzunluğunda, küçük ve hidrofobik peptitlerdir. *E. faecalis*'te sinyal peptitleri olarak fonksiyon görmektedirler. Seks feromon sistemi ile suşlar arasında

konjugatif plazmidlerin transferi birkaç kat artırılmaktadır (Clewell, 1993; Eaton ve Gasson, 2001).

E. faecalis suşları, kültür ortamında farklı seks feromonlar salgılamaktadır. Alıcı enterokok tarafından üretilen seks feromon, verici hücrede AF üretimini sağlamaktadır. Böylece alıcı ve verici hücre arasında sıkı temas sağlanır ve konjugatif plazmidin geçişi kolaylaşır (Murray, 1998; Eaton ve Gasson, 2001; Kayaoglu ve Ørstavik., 2004). Ayrıca antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virülens faktörleri seks feromon sistemi ile *E. faecalis* suşları arasında yayılabilmektedir (Kayaoglu ve Ørstavik., 2004). Bazı seks feromonlar, nötrofiller için kemotaktiktir, süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükler ve bu sayede doku hasarı oluşturur (Sannomiya ve ark., 1990).

1.3.11. Biyofilml oluşumu

Enterokokların oluşturduğu biyofilmler; endokardit ve üriner sistem infeksiyonlarına neden olmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009). Glukoz, demir ve CO₂'nin varlığı, ozmolarite, pH ve sıcaklık gibi faktörler, farklı bakteriler tarafından üretilen biyofilmi etkilemektedirler. Karbonhidrat metabolizması çeşitli Gram pozitif bakterilerde özellikle *E. faecalis*'lerde biyofilm üretimini düzenlemektedir. Yüksek düzeyde glukoz konsantrasyonu varlığında; enterokok yüzey proteini, biyofilm oluşumunu arttırmaktadır (Mohamed ve Huang, 2007).

Yapılan bir çalışmada; ESP pozitif *E. faecalis* FA2-2 (pESPF) ve OG1RF (pESPF) suşları ile, ESP negatif *E. faecalis* FA2-2 (pAT28) ve OG1RF (pAT28) suşları kıyaslandığında, ESP pozitif suşlarda daha kıvamlı ve kalın biyofilm oluşumu saptanmıştır. Aynı çalışmada % 0.5, % 0.75 ve % 1'lik glukoz konsantrasyonlarında, *E. faecalis* E99'un daha fazla biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir (Tendolkar ve ark., 2006).

Patojen mikroorganizmaların gıdaların temas ettiği yüzeylere bağlanma potansiyeli, hijyenik sorunlara yol açabilmektedir. Enterokoklar tarafından oluşan

biyofilmler gıda endüstrisinde kurutma, temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerine ve deterjanlara dayanıklıdır. Gıda endüstrilerinde ıslak yüzeyler; biyofilm oluşturan bakterilerin tutunma ve kolonizasyonunu desteklemektedir. Biyofilmler gıda sanayilerinde kontaminasyona neden olarak gıda hijyeni ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Ayrıca enterokokal yüzey protein, enterokokların gıda ile temas ettikleri yüzeylerde biyofilm oluşumunu arttırmaktadır (Necidová ve ark., 2009; Shi ve Zhu, 2009).

1.3.12. *Enterococcus faecalis* Antijen A Proteini (EfaA Proteini)

İlk olarak endokarditte neden olan *E. faecalis* izolatlarında tanımlanan EfaA proteini, *efaA* geninde kodlanmaktadır. EfaA'nın amino asit dizisinin, streptokokal adezinler olarak bilinen proteinlerle % 55-60 oranında homolog olduğu gösterilmiştir (Lowe ve ark., 1995).

E. faecalis suşlarında EfaA, manganez transport sistemi için bağlayıcı protein reseptörüdür. Mikroorganizmanın sitoplazmasında; katyon homeostazisi, yaşaması ve çoğalması için manganez gerekir. EfaA'nın, manganezden fakir olan ortamda fazla miktarda eksprese edildiği ve endokarditlerde adezin olarak fonksiyon gördüğü bildirilmiştir. Ayrıca klinik örneklerden, hastane ortamından, süt, peynir ve et gibi gıdalardan izole edilen *E. faecalis* suşlarında da EfaA'nın bulunduğu gösterilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Low ve ark., 2003).

1.3.13. Antibiyotik Dirençlilik

Antibiyotik kullanımının antibiyotik direncine neden olmasına yol açan etkenler arasında; sosyoekonomik, turizm, ithalat, infekte hastaların hastaneler arasında yer değiştirmesi, antibiyotiklerin kullanım talimatlarına uyulmaması, çapraz kontaminasyon ve antibiyotik kalıntı ölçümlerinin eksikliği gibi faktörler yer almaktadır (Barbosa ve Levy, 2000).

Antibiyotik direnç kromozomal değişikler veya genetik materyallerin yer değiştirmesi sonucunda meydana gelmektedir. Antibakteriyel direnç endojen olarak; mutasyon ve seleksiyonla mikroorganizmada, ekzojen olarak; çevresel organizmaların (antibiyotik üreticileri, insan kaynaklı olmayan patojenler vb.) insan patojenlerine horizontal gen transferiyle ortaya çıkmaktadır. Antibakteriyel maddelerin eksojen ve endojen direnç mekanizmaları Çizelge 1.2’de gösterilmektedir (Silver, 2011).

Çizelge 1.2 Antibakteriyel maddelerin eksojen ve endojen direnç mekanizmaları (Silver, 2011).

Direnç kaynağı	Mekanizma	Etkilenen antibiyotik sınıflarına örnek
Ekzojen	Spesifik efluks mekanizması	Tetrasiklin, makrolidler
	Spesifik modifikasyon	β -laktamlar, aminoglikozidler, kloramfenikol, streptogramin A, metronidazol (anaeroblar için), fosfomisin
	Hedef hücre koruyucu	Tetrasiklin, makrolidler, linkozamidler, oksazolidinonlar, streptogramin B
	Düşük afiniteli hedef hücre ile yer değiştirme	β -laktamlar, vankomisin, trimetoprim, mupirosin, sülfonamidler
	Hedef hücrenin ayrı tutulması	Florokinolonlar, fusidik asit
Endojen	Hedef hücre afinitesini azaltarak tekli mutasyonlar	Rifamisin, streptomisin, trimetoprim (Gram (+) organizmalar için), fusidik asit
	Afiniteyi azaltarak veya hedefi yeniden modelleyerek çoklu mutasyonlar	Florokinolonlar, oksazolidinonlar, daptomisin, vankomisin, polimiksin, β -laktamlar
	Azaltılmış alım (porin veya permeaz kaybı)	Karbapenemler, fosfomisin
	Aktivasyon kaybı	Metronidazol
	Hedef hücre üzerinde bulunan reseptörlerin artması	Fosfomisin
	Genel efluks mekanizması	<i>Pseudomonas</i> ’lar ve pek çok diğer türler için

Mutasyonlar genel olarak antibiyotiklerin hedef aldıkları bölgeleri bazı değişiklere uğratarak, horizontal gen transferi ise farklı bir mikroorganizmaya ait genetik materyalinin aktarılmasını sağlayarak antibiyotik direncine neden olmaktadır (Andersson ve Hughes, 2010; Silver, 2011). Transfer edilebilen direnç

genleri, yabancı bir DNA'nın konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyonu ile kazanılmaktadır (Klare ve ark., 2003; Andersson ve Hughes, 2010).

Bakteriler ;

1. Bakteri hücre duvarının permeabilitesinin değişiklere uğraması ve antibiyotiklerin hedef sitelerine erişiminin azalması,
 2. Bakterilerde aktif efluks pompa sistemlerinin bulunması,
 3. Antibiyotiğin enzimatik modifikasyonları,
 4. Antimikrobiyel maddenin bozulması veya azalması,
 5. İlaç tarafından engellenmiş olan alternatif metabolik yolların kazanılması,
 6. Antibiyotik hedeflerin modifikasyonu,
 7. Hedef enzimin fazla üretimi
- gibi mekanizmaların vasıtasıyla antibiyotiklere dirençli hale geldikleri bildirilmiştir (Andersson ve Hughes, 2010).

Antibakteriyal ajanların etki mekanizmaları;

1. Hücre duvarı sentezine engel olarak:
 - a. Beta-laktamlar: penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam, ampisilin
 - b. Glikopeptidler: vankomisin, teikoplanin
2. Protein sentezini engelleyerek:
 - a. 50S ribozomal subüniteye bağlanarak: makrolidler, linkozamid, streptogramin, kloramfenikol, klindamisin, kinupristin-dalfopristin, linezolid, everninomisin
 - b. 30S ribozomal subüniteye bağlanarak: aminoglikozitler (gentamisin, tobramisin), tetrasiklinler
 - c. Bakteriyal izölöykil-tRNA'ya bağlanarak: mupirosin
3. Nükleik asit sentezini engelleyerek:

- a. DNA sentezini engelleyerek: kinolonon
- b. RNA sentezini engelleyerek: rifampin

olmak üzere beş farklı başlık altında toplanabilmektedir (Klare ve ark., 2003; Tenover, 2006; Sood ve ark., 2008).

Nozokomiyal enterokok infeksiyonlarının gelişiminde iki basamaklı bir süreçten söz edilmektedir. Hastanede yatan hastalarda, öncelikle antibiyotik direnci olan ve çeşitli virülens faktörlerini barındıran hastane kaynaklı enterokoklar ile asemptomatik gastrointestinal kolonizasyon gelişmektedir. Sonraki aşamada, gastrointestinal floranın antibiyotiklerle baskılanması sonucu ortaya çıkan dirençli suşlar, doku invazyonuna neden olmaktadır (Sood ve ark., 2008). Sonuçta enterokok infeksiyonlarının gelişiminde; adezyon, translokasyon ve bağışıklık sisteminden kaçışı içeren çeşitli virülens özellikler etkin olmaktadır (Vankerckhoven ve ark., 2008).

Enterokoklar diğer Gram (+) bakterilerin duyarlı olduğu birçok antibiyotiğe kısmen veya tamamen dirençlidir. Bu sebeple enterokok infeksiyonlarının tedavisi, klinikte karşılaşılan önemli sorunlardan birisidir (Sood ve ark., 2008). Antibiyotik dirençli bakteriler sonucu gelişen infeksiyonlar, hastalarda morbidite ve mortalitenin artmasına neden olmaktadır (Anon, 2005).

Enterokoklarda antibiyotiklere direncin mekanizması iki şekilde ortaya çıkmaktadır.

1. İntrinsik (doğal-kromozomal) Direnç
2. Kazanılmış direnç (Sood ve ark., 2008)

1.3.13.1. İntrinsik direnç

Bu direncin temelinde mikroorganizmaların metabolik olarak inaktif fazda bulunması veya ilacın etki mekanizmasına uygun hedef yapıların bulunmaması vardır. Örneğin; *Mycobacterium tuberculosis*'in kalsifiye odaklarda

metabolizması yavaşlamış olarak uzun süre canlı kalabilmesi ve bunun sonucunda antitüberküloz ilaçlara dirençli olması verilebilir. Bir diğer örnek *Mycoplasma*'lar gibi hücre duvarı olmayan mikroorganizmalar betalaktam gibi hücre duvar sentezi inhibitörlerine intrinsik dirençlidirler (Cox ve Wright 2013).

Intrinsik direnç, enterokok türlerinde kromozomal direnç genleriyle ilişkilidir (Jankoska ve ark., 2008). Bu direnç bakterilerin tür veya cinslerine bağlı bir özelliktir. Örneğin; genellikle *E. faecalis* streptograminlere ve *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* düşük düzeyde vankomisine intrinsik direnç göstermektedir (Klare ve ark., 2003).

Enterokoklar; sefalosporinlere, β -laktamlara, sulfonamidlere, penisilinlere, klindamisine, düşük seviyede aminoglikozidlere, florokinolonlara, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX), polimiksinlere, monobaktamlara intrinsik direnç göstermektedirler (Cetinkaya ve ark., 2000; Klare ve ark., 2003).

1.3.13.1.1. β -laktam direnci

Enterokoklar, β -laktam antibiyotiklere karşı karakteristik olarak direnç (Minimum inhibisyon konsantrasyonu, MİK>32 $\mu\text{g/ml}$) gösterebilmektedirler (Cetinkaya ve ark., 2000). Bu nedenle β -laktam antibiyotikler, enterokoklara karşı bakterisidal değil, bakteriyostatik etkilidir (Marothi ve ark., 2005).

Enterokoklarda intrinsik penisilin direnci, β -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 *E. faecium* suşlarında penisilin direnci (MİK=16-64 $\mu\text{g/ml}$), *E. faecalis*'e (MİK=1-8 $\mu\text{g/ml}$) oranla daha sık görülmektedir. Düşük afiniteli PBP-5 proteinin aşırı üretimi, *E. faecium*'un penisiline karşı yüksek düzey direncine neden olduğu düşünülmektedir (DeLisle ve Perl, 2003). Ampisilin direnci *E. faecium* suşlarının % 85-90'ında, *E. faecalis* suşlarının ise % 0.5-1'inde görülmektedir (Klare ve ark., 2003).

1.3.13.1.2. Düşük düzeyde aminoglikozid direnci

Enterokoklarda görülen düşük düzeyde aminoglikozid direnci, bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanmaktadır (Murray, 1990; Sood ve ark., 2008). Aminoglikozidler bakteri hücre duvarından enerji bağımlı mekanizma ile geçtiklerinden ve enterokoklarda sitokrom enzimleri olmadığından geçirgenlik azalmaktadır (Klare ve ark., 2003). Ancak aminoglikozid grubu ilaçlar, hücre duvarı sentezini engelleyen β -laktam'lar gibi antibiyotiklerle kombine edilirse zedelenen hücre duvarından daha kolay geçeceklerinden sinerjistik etki oluşacak ve MİK değerleri önemli ölçüde düşecektir. Ayrıca ampisilin direnci veya aminoglikozide karşı kazanılmış direnç durumlarında bu sinerjistik etki oluşmamaktadır (Klare ve ark., 2003; Sood ve ark., 2008).

1.3.13.2. Kazanılmış direnç

Antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç gelişimi, iki yolla oluşmaktadır;

1. DNA mutasyonlarına bağlı kazanılmış direnç (kromozomda mutasyon)
2. Plazmidler (konjugasyon veya transformasyon), transpozonlar (konjugasyon) integronlar ve bakteriyofajlar (transdüksiyon) tarafından direnç geninin alınmasına bağlı kazanılmış direnç (Klare ve ark., 2003 ; Jankoska ve ark., 2008; Giedraitienė ve ark., 2011).

Enterokoklar; yüksek seviyede β -laktamlar, tetrasiklin, vankomisin, yüksek seviyede klindamisin ve aminoglikozidler, glikopeptitler, eritromisin, rifampin, fluorokinolonlar, tetrasiklin, kloramfenikol, oksazolidinon, linkozamid ve streptogramine kazanılmış direnç göstermektedirler (Cetinkaya ve ark., 2000; Klare ve ark., 2003; Sood ve ark., 2008).

1.3.13.2.1. Yüksek düzeyde β -laktam direnci

β -laktam direnci enterokokların tipik özelliğidir. Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile β -laktam antibiyotiklere direnç göstermektedirler. Direncin ana 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 görülmektedir. PBP5 sentez yeteneğinin kaybı, penisiline oldukça dirençli suşların aşırı duyarlı olmalarına neden olmaktadır (Cetinkaya ve ark., 2000).

β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin diğer mekanizması ise β -laktamaz üretimidir. β -laktamaz üreten enterokoklar nadir olarak izole edilmektedir (Marothi ve ark., 2005). β -laktamaz üreten ilk suş 1981 yılında Murray (1992), tarafından ABD’de tanımlanmıştır. β -laktamazların çoğu yüksek düzeyde gentamisin direnç geni taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmaktadır (Murray, 1998). Enterokoklardaki β -laktamazlar; penisilin, ampisilin, piperasilini hidrolize ederken sefalosporinleri ve imipenemi etkilememektedir (Murray, 1992).

1.3.13.2.2. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci

Enterokoklarda aminoglikozidlere karşı direnç, iki farklı mekanizma ile ortaya çıkmaktadır:

1. Ilımlı seviyede direnç (MİK= 62-500 μ g/ml); genellikle düşük permeabiliteden dolayı gelişmektedir. Aminoglikozidler ile hücre duvarı sentezini inhibe eden β -laktam grubu antibiyotikler kombine edildiğinde bu tip direnç problemi aşılabilmektedir (Cetinkaya ve ark., 2000).

2. Yüksek seviyede direnç (MİK>2000 μ g/ml); aminoglikozidlerin ribozomdaki bağlanma bölgelerindeki değişiklik veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşmaktadır (Cetinkaya ve ark., 2000; Marothi ve ark., 2005).

Enterokoklarda gentamisin ve streptomisine karşı direnç farklı mekanizmalarla oluştuğundan, duyarlılık testlerinde bu ajanların kullanılması önemlidir (Herman ve Gerding, 1991). Streptomisin hariç diğer aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde dirençten, bifonksiyonel enzim olan 2'-fosfotransferaz-6'-asetil transferaz sorumlu olmaktadır. Bu enzim, gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin ve kanamisin direnç oluşumunu sağlamaktadır. Bu yüzden gentamisin direnci, streptomisin hariç diğer aminoglikozitlere olan direncin iyi bir göstergesidir. Streptomisin direnci, ribozomal mutasyonlar veya adenil transferaz sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır ve bu suşlar diğer aminoglikozidlere duyarlı kalmaktadır. Kanamisin ve amikasin-penisilin sinerjisi direnci ise 3'-fosfotransferaz sentezlenmesi sonucu oluşmakta ve bu suşlar gentamisine duyarlı kalmaktadır (Herman ve Gerding, 1991; Marothi ve ark., 2005). Ampisilin-aminoglikozid sinerjisi, yüksek düzeyde aminoglikozid direnci olan enterokokları etkilemektedir (Klare ve ark., 2003).

1.3.13.2.3. Kloramfenikol direnci

Yapılan bazı çalışmalara göre enterokokların % 20-42'sinin kloramfenikole dirençli oldukları bildirilmiştir (Murray, 1990). Dirençten sorumlu esas mekanizma, plazmid üzerinde *cat* geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir (Klare ve ark., 2003).

1.3.13.2.4. Tetrasiklin direnci

Dirençten sorumlu *tetM*, *tetQ* ve *tetN*, *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bu genlerin efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribosomal kaynaklı dirence de sebep olabildikleri bildirilmiştir (Leclercq, 1997; Klare ve ark., 2003).

1.3.13.2.5. Kinolon direnci

Direnç *gyrA* (giraz) ve *parC* (topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı gelişmektedir. Enterokok suşların çoğu kinolonlara orta düzeyde duyarlılık veya direnç göstermektedirler (Klare ve ark., 2003).

1.3.13.2.6. Makrolid, linkozamid ve B tipi streptogramin (MLSB) direnci

Genellikle 23S rRNA'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkilidir (Portillo ve ark., 2000). *ErmB* geni *Tn917* transpozonu ile çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilmektedir (Murray, 1990; Klare ve ark., 2003). Ayrıca efluks mekanizması sonucu da oluşabilmektedir (Portillo ve ark., 2000).

1.3.13.2.7. Oksazolidinon direnci

Enterokoklar ile oluşan infeksiyonlarda oksazolidinon grubu antibiyotikler içerisinde olan linezolid iyi bir seçenektir. Ancak tedavi sırasında, *E. faecalis* ve *E. faecium* gibi klinik izolatlarda linezolid direncin ortaya çıkabildiği bildirilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium*'larda linezolid dirençten, 23S rRNA'da V domainindeki *G2576T* genin mutasyonları sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca *G2528U* ve *G2505A* genlerinde mutasyonlar, in vitro olarak enterokoklarda linezolid direncine neden olmaktadır (Gómez-Gil ve ark., 2009).

1.3.13.2.8. Glikopeptit direnci

Enterokok infeksiyonlarında vankomisin ve teikoplanin en çok kullanılan glikopeptitlerdir. Bu nedenle bakterinin bu antibiyotiklere dirençli olması büyük önem taşımaktadır. Enterokoklarda peptidoglikan sentezinde; iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanır ve "D-Ala-D-Ala" yı oluşturur. Sonra UDP-N-asetil muramil tripeptide eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptidi meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana bağlanır, çapraz bağların oluşumunu sağlar ve peptidoglikan tabakanın gücüne katkıda bulunur.

Vankomisin, pentapeptidinin D-Ala-D-Ala kısmına yüksek affinite ile bağlanır ve peptidoglikan zincire bağlanmasını bloke ederek çapraz 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 (Sood ve ark., 2008).

Glikopeptit direncin sınıflandırılması önceleri, fenotipik olarak, MİK değerlerine göre yapılmıştır. Günümüzde ise sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. *Van A*, *Van B*, *Van D* tipi dirençte D-Ala-D-Laktat, *Van C* ve *Van E* tipi dirençte ise, D-Ala-D-Serin sentezlenmektedir (Murray, 1998; Cetinkaya ve ark., 2000). Vankomisin direnç genleri, plazmid üzerinde yerleşen *Tn1546* transpozon tarafından transfer edilmektedir (Leclercq, 1997).

1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Bakteriler antibiyotiklere karşı doğal dirence sahip olabildikleri gibi, kromozomal genlerde meydana gelen mutasyon veya kromozom dışı (plazmid, transpozon) genetik materyalin kazanılması sonucu da direnç geliştirebilmektedirler (Blázquez ve ark., 2002; Rodríguez-Rojas ve ark., 2013; Blair ve ark., 2015).

Direnç gelişiminde; enzim üretimi, bağlanma noktalarının modifikasyonu, membran geçirgenliğinin bozulması ve pompa mekanizması gibi çeşitli mekanizmalar rol oynamaktadır. Enzim üretimine bağlı direnç gelişimi; beta-laktam, aminoglikozid ve kloramfenikol grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır (Blázquez ve ark., 2002; Rodríguez-Rojas ve ark., 2013; Blair ve ark., 2015).

Bağlanma noktalarının modifikasyonu; penisilin, kinolon, makrolid ve tetrasiklin grubuna karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Membran geçirgenliğinin bozulması sonucu; beta-laktam, penisilin, kinolon grubuna karşı

direnç gelişebilmektedir. Pompa mekanizması ise; karbapenem, kinolon, tetrasiklin ve makrolidlere karşı dirençte önem kazanmıştır (Blázquez ve ark., 2002; Rodríguez-Rojasve ark., 2013; Blair ve ark., 2015).

Günümüzde antibiyotik direncinin temel mekanizmaları oldukça iyi anlaşılmış olmasına rağmen halen ortaya çıkarılmakta olan yeni mekanizmalar söz konusudur. Yeni tanımlanmakta olan ve hala üzerinde yoğun çalışmaların sürdüğü bu mekanizmalara pompa mekanizmasının yanı sıra, hypermutability, integronlar ve plazmid bağımlılığı gibi mekanizmalar örnek olarak verilebilmektedir (Blázquez ve ark., 2002; Rodríguez-Rojasve ark., 2013; Blair ve ark., 2015).

1.4.1. Plazmid

DNA'nın bir parçası olan plazmidler birden fazla antibiyotiğe karşı direnci kodlayabilen ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Bağımsız ve kendi kendilerine çoğalabilmektedirler. Ayrıca konjugatif plazmidler, kendilerinin transferini sağlayacak ilave genlere de ihtiyaç duydukları bildirilmektedir. Bazı küçük plasmidler birlikte var olduğı konjugatif plazmidin konjugasyon aparatını kullanarak kendi transferlerini gerçekleştirebilmektedirler. Plazmidler; bakterilere, antibiyotik direnci yanında bakterinin virölansını ve metabolik kapasitesini değıştirebilecek özelliklerde kazandırabilmektedirler Plazmidler birkaç yolla antibiyotik direncinin hızla yayılmasına yol açabilmektedirler. Belirli bir organizmanın tek bir klonunun mutasyon geçirmesi veya bir plazmidi kazanması ile dirençli hale gelebilmektedir. Meydana gelen bu dirençli organizma belirli yerlere özellikle iyi adapte olabilmesini sağlayan genlere sahip olmaktadır. Plazmidlerdeki direnç genleri transpozonlar, integronlar, gen kasetleri gibi küçük mobil genetik elementler içine yerleşebilmektedirler. Bazen bu direnç topluluğındaki diğerk direnç genleri ile bağlantılı plazmidlere veya kromozomlara transfer edilebilmektedir. Bu şekilde birbiri ile ilişkisiz birden fazla ilaca karşı eş zamanlı direnç (çoklu ilaç direnci) gelişebilmektedir (Bennett, 2008; Verraes ve ark., 2013).

1.4.2. Transpozon

Transpozonlar ise bakteri kromozomunun değişik yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmidden plazmide, plazmidden DNA veya bakteriyofaja aktarılabilen DNA elementleridir. Bu elementler kendi kendilerine replike olmadıkları için kromozom, plazmid veya bakteriyofaj gibi bir replikon üzerinde bulunmaktadır. Kromozom veya plazmid üzerindeki direnç genleri, bakterinin bölünmesi ile yavru hücrelere aktarabilmektedirler (vertikal geçiş). Bu yeni hücrelerin çoğalması ile direnç genlerinin yayılması gerçekleşmektedir (klonal yayılım). Plazmidler konjugasyon ile yatay olarak aktarılabilirler. Bazı transpozonlar bir bakterideki kromozomdan bir diğerine direkt olarak geçebilmektedir (konjugatif transpozon). Konjugatif transpozonlar gram pozitif bakterilerdeki kromozomal direncin transferinden sorumlu olmaktadır (Bennett, 2008).

1.4.3. Bakterilerin Horizontal Gen Transferinde Rol Oynayan Mekanizmalar

Direnç genlerini taşıyan genetik materyal ve plazmidler bir bakteriden diğerine transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon gibi mekanizmalarla aktarılabilir (Verraes ve ark., 2013).

1.4.3.1. Konjugasyon

İki bakteri hücresinin teması sonucunda genetik elemanın aktarımıdır. Türler arası plazmid aktarımının in vivo koşullarda da oluşabilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca direnç plazmidleri Gram (+) ve Gram (-) bakteri türleri arasında da aktarılabilirler (Huddleston, 2014). Konjugasyon; konjugatif veya non-konjugatif plazmidler veya transpozonlar transferini içermektedir. Son zamanlarda “Bütünleştirici Konjugatif Elementler” (Integrative Conjugative Elements, ICE) veya “Bütünleştirici Hareketli Elementler” (Integrative Mobilizable Elements, IME) olarak sınıflandırılmaktadır. Non-konjugatif plazmidlerin transferi *tra* genlerinin varlığında mobil elementler tarafından sağlanmaktadır. Birçok

antimikrobiyal direnç genleri plazmidler ve transpozonlar gibi mobil elemanlar üzerinde bulunmaktadır. Konjugasyonun; bakteriler arasında antimikrobiyal direnç genlerinin transferinde önemli rolü olduğu kabul edilmiştir (Verraes ve ark., 2013).

1.4.3.2. Transformasyon

Bir hücrenin içine yabancı bir DNA'nın girmesi, bu DNA'nın genomunun parçası haline gelmesi ve DNA'daki genlerin ifade olması sonucu, hücrenin değişime uğramasıdır (Huddleston, 2014). Bakterilerde bulunan kromozomal veya ekstrakromozomal DNA; transformasyonu ile transfer edilebilmektedir. Gıdalarda transformasyon ile antimikrobiyal direnç genlerin transferi gösterilmemiştir. DNA nükleazlar, fiziksel ve kimyasal indirgeme gibi gıda işlemleri sırasında DNA savunmasızdır. Ancak sosiste gösterildiği gibi bazı gıda işlemleri ortamında (örneğin, biyofilm) DNA korunabilmektedir. DNA plazmidler veya kromozomların homolog bölgeleri ile rekombine olarak alıcı hücrelerine transfer edilebilmektedir (Verraes ve ark., 2013).

1.4.3.3. Transdüksiyon

Bakteriyofajlar (bakteri virüsleri) rezistans plazmidinin taşıyıcılığını (vektörlüğünü) yapmaktadır. Bakteri içine giren bakteriyofaj onun R plazmidini, kendisinin viral protein kılıfı içine alır ve bölünerek plazmidin kopyasını içeren çok sayıda yavru bakteriyofaj oluşturur. Sonuçta bakteri hücresi patlar ve ortama R plazmidi içeren yüzlerce yeni bakteriyofaj saçılır. Bunlarda aynı veya farklı türden diğer bakterileri infekte ederler ve onları rezistan duruma getirirler (Verraes ve ark., 2013; Huddleston, 2014).

1.4.4. Enzimatik İnhibisyon

Enzim üretimine bağlı direnç gelişimi beta-laktam, aminoglikozid ve kloramfenikol grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde rol oynamaktadır (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Ramirez ve ark., 2013).

1.4.5. Ribozomal Hedef Yerinde Değişiklik

Tetrasiklin, makrolid, linkozamid, aminoglikozid ve streptograminler gibi bazı antibiyotiklere karşı gelişen dirençte ribozomal bağlanma yerlerinde meydana gelen mutasyonların etkili oldukları belirlenmiştir. Makrolidlerde direnç; 23S rRNA genlerinde ve ribozomda bulunan L4 ve L22 proteinlerinde oluşan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Tek nükleotid polimorfizmi (genomda tek bir nükleotidin değişmesi şeklindeki mutasyon, SNP); kinolon, sülfonamid ve trimetoprim gibi sentetik antibiyotiklerde direnç gelişimine neden olmaktadır. Ribozomun S12 proteinini kodlayan *rpsL* geninde oluşam mutasyon; streptomisinlerde yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır. Bir sitoplazma enzimi olan, D-Ala-D-Ala ligazı kodlayan ve kromozomda bulunan *ddl* geninde mutasyon; glikopeptidlere direnç gelişimine neden olmaktadır (van Hoek ve ark., 2011).

Antibiyotiklerin çeşitli grupları, 50S ribozomal alt ünitenin fonksiyonuna müdahale ederek protein sentezini engellemektedirler. Bu antibiyotiklere direnç 50S ribozomal alt ünitenin 23S parçasığının spesifik metilasyonu ile elde edilebilmektedir. Antibiyotiklerin bir bileşik grubu olan makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS_B); 50S ribozomal'ın içerisinde, peptidil transferaz merkezine yakın sitelere bağlanmaktadır (Morić ve ark., 2010).

A2058 nükleotidin N6 pozisyonunda spesifik metilasyonu; 23S rRNA'nın V bölgesinde Erm metiltransferaz (MTases) tarafından katalize olmaktadır. Bu nükleotidlerde, Erm metiltransferaz tarafından oluşan değişiklikler veya mutasyonlar antibiyotik direncine sebep olmaktadır. Erm metiltransferaz; bir veya

iki metil gruplarını A2058'e eklemetedir. Monometilasyon; MLS_B fenotipe I tipi dirence neden olmaktadır. Bu tip dirençte linkozamidlere yüksek düzeyde, makrolid ve streptogramin B'lere düşük veya orta düzeyde direnç gelişmektedir. Erm metiltransferaz; MLS_B fenotipe II tipi dirence neden olmaktadır. Bu dirençte tüm MLS_B antibiyotiklere ve telitromisin karşı yüksek düzeyde direnç gelişmektedir. Bu direnç mekanizması patojen bakteriler arasında daha yaygın olmaktadır. Yine 16S rRNA alt ünite de bulunan G1405 or A1408 nükleotidlerinde oluşan mutasyon aminoglikozidlere direnç gelişiminde rol oynamaktadır (Morić ve ark., 2010).

Membran geçirgenliğinin bozulması sonucu beta-laktam, penisilin, karbapenem ve kinolon grubuna karşı direnç gelişebilmektedir (Shaikh ve ark., 2015). Bakteriyel membran; belirli maddelerin hücreye girmesine ve çıkmasına izin verirken, zararlı bileşiklerin geçmesini engellemektedir. Hücre membranında geçirgenliğin değişmesi Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde saptanmıştır. Bakterinin dış membranında bulunan ve antibiyotiklerin hücre içine girmesini sağlayan porin proteinlerinde oluşan mutasyonlar sonucu ve hücre yüzeyinde bulunan lipid A değişiklikler sonucu direnç gelişmektedir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında; OprD porindeki değişim, karbapenem, *E. coli*'de; OmpC ve OmpF porinlerindeki değişim beta-laktam ve *Enterobacter cloacae*'de; OmpF porindeki değişim, karbapenem direncine yol açabilmektedir. *Enterobacter aerogenes*'de; OmpC ve OmpF porindeki değişim karbapenem direncine yol açarken Omp porindeki değişim imipenem, sefepim ve sefpirom direncine neden olmaktadır (Fernández ve Hancock 2012).

1.4.6. Aktif Pompa Sistemleri (Efluks Pompası)

Aktif pompa sistemlerinin varlığı ilk olarak Levy ve McMurry tarafından 1978 yılında, *E. coli*'de tetrasiklinler için belirlenmiştir. Aktif pompa sistemleri; Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde bulunabilen, antibiyotikler dahil toksik maddelerin hücre dışına atılmasını sağlayan transport proteinleridir. Efluks pompası; bir ya da birden fazla bileşenden oluşmaktadır. Efluks sistemleri Gram (+) bakterilerde;

sitoplazmik zarında bulunan tek bir polipeptit içeren pompalardır. Gram (-) bakterilerde ise; iç ve dış membran bileşenlerinden oluşup ve periplazmada yer almaktadır (Fernández ve Hancock 2012). Bu pompa sistemleri bakterilerde doğal veya bazen kazanılmış dirence sebep olmaktadır (Kumar ve Schweizer 2005; Li ve ark., 2015). Çizelge 1.3’de bazı enterokok türlerinde efflux pompa sistemlerinin neden olduğu antibiyotik direnci verilmiştir (Fernández ve Hancock 2012).

Çizelge 1.3’de bazı enterokok türlerinde efluks pompa sistemlerinin neden olduğu antibiyotik direnci verilmiştir (Fernández ve Hancock 2012).

Efluks pompa sistemi	Pompaların alt ünitesi	Bakteri türleri	Antibiyotik direnci
ABC	MsrC	<i>E. faecium</i>	ML
	EfrAB	<i>E. faecalis</i>	FQ, TC
MFS	QepA	<i>E. aerogenes</i>	FQ
	EfmA	<i>E. faecium</i>	FQ
MATE	EmmdR	<i>E. cloacae</i>	FQ, TM
RND	AcrAB, TolC	<i>E. aerogenes</i>	CM, FQ, NB, TC
	EefABC	<i>E. aerogenes</i>	CM, CI, EM, TC
	AcrAB, TolC	<i>E. cloacae</i>	AG, BL, CM, FQ, EM, TC, TI

AG, Aminoglikozidler; BL, β -lactams; CI, Siprofloksasin; CM, Kloramfenikol; CL, Klindamisin; EM, Eritromisin; FQ, Florokinolon; ML, makrolid; NB, Novobiyosin; TC, Tetrasiklin; TI, Tigesiklin; TM, Trimetoprim

1.4.7. İntegronlar

İntegronlar; dirençlilik genlerinin kazanılmasından sorumlu özel genetik elementleri olarak 1987 yılında Stokes ve Hall tarafından tanımlanmıştır. Yapılan analizlere göre integronlar, *Shigella* izolatlarında bulunan r genleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. İntegronlar ve gen kasetleri bakteri genlerinin yayılmasında, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin antibiyotik direnç gelişiminde önemli oldukları saptanmıştır (Davies ve Davies 2010).

İntegronlar kendileri; mobil (hareketli) genetik elementleri olmamaktadırlar ancak isersiyon dizileri, plasmidler ve transpozonlar ile birlikte bir mobil elementi olup transferi sağlanmaktadır (Rowe-Magnus ve Mazel 2002; Davies ve Davies 2010).

PCR yönteminde; integron, integraz ve spesifik primerlerin kullanımı ile toprak, tortu ve diğer doğal ortamlarının DNA örnekleri analiz edilmiştir. Bu örneklerin integron kasetlerinde direnç özelliği bulunmamıştır. Ancak, hastane örneklerinin bakteri popülasyonları, tarım siteleri, atık su arıtma tesisleri ve benzeri çevresel kaynaklarında integronlar ile *r* gen kasetlerinin birleşmesi saptanmıştır. Bu integronların, direnç genlerinin yayılmasında önemli oldukları bildirilmiştir. İntegraz ve bakteriyofaj rekombinaz arasındaki dizinin benzerlik göstermesine rağmen integronların kökenleri, bilinmemektedir (Davies ve Davies 2010).

İntegron; integrazı kodlayan *intI* genini, rekombinasyon sitesini (*attI*), gen kasetlerini ve promotörü içermektedir. İntegronlar; direnç integronları (RI) ve süper-integronları (SI) olarak iki ana gruba ayrılmaktadırlar (Meawad ve ark., 2015). *IntI* geni tirozin rekombinazların bir üyesi olan integraz enzimini kodlamaktadır. Bu enzim farklı bir genetik elementleri olan gen kasetlerini katalize etmektedir (Cambray ve ark., 2010). Antibiyotik direncini kodlayan gen kasetlerinin, itegronlanlarda stoklanması nedeniyle çoklu direnç integronlar oluşmaktadır (Rowe-Magnus ve Mazel, 2002).

Enterokoklar; yeni direnç genlerini kazanma ve yeni antibiyotiklere dirençli olma kapasitesine sahip olmaktadır. Bu bakteriler işlem görmüş etlerde ve fermentasyon sırasında hayatta kalabilmektedirler. Ayrıca gıdalarda biyofilm oluşturabilmektedirler (Jahan ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada, plazmidler üzerinde bulunan tetrasiklin ve eritromisin direnç genlerinin *E. faecalis* klinik izolatlarında bulunduğu ve bu genlerin diğer enterokok ve bakterilere, kuru fermente sosislerin olgunlaşması sırasında tranfer edilmesi saptanmıştır. Bu nedenle hayvansal gıda kaynaklı enterokokların; transfer edilebilir genetik

elementleri üzerinde bulunan antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli oldukları bildirilmiştir (Gazzola ve ark., 2012).

Antibiyotik direnç genlerinin bakteri türleri ve cinsleri arasında yatay geçişi; konjugatif plasmidler, transpozonlar, integronlar ve insersiyon elementleri ile meydana geldikleri saptanmıştır. Gıda zinciri; hayvan ve insan popülasyonları arasındaki antibiyotik dirençli bakterilerin yayılmasında ana yollarından biri olabilmektedir. Tüketimden önce ısı işlemi görmeyen fermente et ürünleri; hayvan mikroflora ve insan gastrointestinal sistem mikroflora arasında antibiyotik dirençli bakteriler için doğrudan bir araç olmaktadır (Jahan ve ark., 2015).

1.5. Vankomisin Dirençli Enterokoklar

Vankomisin dirençli enterokoklar kontamine sular ile sulanma, atık sular ve dışkıları gibi çeşitli çevresel kontaminasyon kaynakları yoluyla bitkisel gıdalara bulaşabilmektedir (Giraffa, 2002). Kesim yerlerindeki hijyen eksikliği sonucunda karkaslar bağırsak içeriği ile kontamine olarak hayvansal gıdaların bu dirençli türler için bir vektör olmasına neden olabilmektedir (Lemcke ve Bülte, 2000).

Kontamine gıdalar aracılığı ile VRE'lerin insanlara transfer edilebilmesi *Tn1546* geni ile gerçekleşmekte, transfer edilebilir VRE'lerin *van A* ve *van B* olmak üzere iki farklı genotip olduğu bildirilmektedir (Robredo ve ark., 2000; Giraffa, 2002; Peters ve ark., 2003).

Avrupa Birliği ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda tavukların, insanlarda hastane infeksiyonlarına neden olan antibiyotik dirençli enterokoklar için potansiyel bir rezervuar olduğu ortaya konmuştur (Philips ve ark., 2004). Hayvanlarda antibiyotik büyüme faktörü olarak kullanılan avoparsin beşeri hekimlikte metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* ve antibiyotiklere çoklu direnç gösteren Gram pozitiflerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılan vankomisin ile aynı grupta yer almaktadır. Bu nedenle avoparsin ilave edilmiş rasyonlarla beslenen hayvanlarda ve bu

hayvanlardan elde edilen gıdalarda VRE izole edilebilmektedir (Aarestrup, 1995). Avrupa Birliği'nde 1 Ocak 2006'dan sonra antibiyotik büyüme faktörlerinin (avilamisin, flavofosfolipol, monensin sodyum ve salinomisin sodyum) tümüyle yasaklanmasına karar verilmiştir. Türkiye'de ise 2002/66 numaralı 'Yem Katkı Ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı Ve Kullanımı Hakkında Tebliğ'de belirtildiği üzere antibiyotik büyüme faktörlerinin tümü 21/01/2006 tarihinden itibaren resmi olarak yasaklanmıştır. Bu yasaklama tarihinden önce ithal edilen antibiyotik büyüme faktörlerinin elden çıkarılması amacıyla 21 Ocak 2006'dan sonra 6 ay daha izin verilmiştir. Bu tarihten itibaren hiçbir antibiyotik yem katkı maddesinin Türkiye'ye ithal edilmesine izin verilmemektedir (Anon, 2002 a). Avrupa Birliği 70/524/EEC kararına istinaden 17 Aralık 1998 2821/98 sayılı konsül kararlarınca "Avoparsin, zinc basitrasin, spiramisin, virginamisin, tilosin fosfat" ın yem katkısı olarak kullanılması yasaklanmıştır. Ülkeler bazında ise 1998-1999 yılları arasında İsveç, Finlandiya, Danimarka gibi Kuzey Avrupa ülkelerinde konsül kararlarından önce bu antibiyotiklerin büyüme faktörü ve yem katkısı olarak kullanılması yasaklanmıştır (Anon, 1998).

Enterokoklardaki glikopeptit grubu antibiyotiklere direnç *van A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G* genleri ile ilişkilidir (Werner ve ark., 2008). Bunlardan *van A*, *B*, *D*, *E*, *G* sonradan kazanılmış direnç genleri; *van C1* ve *van C2/C3* intrinsik direnç genleridir. *Van A* ve *van B* en yaygın direnç genotipleri olup yüksek düzey vankomisin ve teikoplanin direncini *van A* geni ile kodlamaktadır. *Van A* tipi glikopeptid direnci *Enterococcus* spp.'lerin çoğunda bulunmaktadır. *Van B* tipi glikopeptid direnci daha çok *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde tanımlanırken değişik konsantrasyonlarda vankomisin direnci gösterdiği, teikoplanine karşı direnç göstermediği saptanmıştır. *Van D* fenotipi ise vankomisine karşı orta düzey, teikoplanine karşı düşük dozda direnç gösterir. *Van E* fenotipinin ise vankomisine karşı düşük düzey direnç gösterdiği, teikoplanine karşı duyarlı olduğu saptanmıştır. *Van C1*, *C2* ve *C3* fenotipleri *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* türlerinin spesifik genleridir. *Van G* genleri; teikoplanine duyarlı, vankomisine orta düzey direnç gösterir ki daha çok klinik izolatlarda bulunan *E. faecalis* türlerinde saptanmıştır (Perez Hernandez ve ark., 2002). Bu genlerin

içinde transpozonlarda lokalize olan *van A* ve *van B* genleri başka mikroorganizmalara aktarılabilir özelliكتedir (Cetinkaya ve ark., 2000).

Teikoplanin ve vankomisin gibi glikopeptidlerin önemi, penisilin, ampisilin gibi antibiyotiklere karşı alerji gösteren kişilerin klinik tedavisinde kullanılmalarından kaynaklanmaktadır (Giraffa, 2002). Glikopeptidlere karşı oluşan direnç bunların kullanılmasına engel olmaktadır. Bu nedenle VRE halk sağlığını tehdit eder konuma gelmiştir (Gelsomino ve ark., 2003). Hem aminoglikozidlere yüksek direnç gösteren hem de glikopeptidlere dirençli enterokokların tedavisi büyük sorunlar yaratmaktadır. Bu nedenle, kloramfenikol, florokinolon, beta laktam antibiyotikler ve aminoglikosid kombinasyonları, kinupristin-dalfopristin önerilen tedavi seçeneklerindendir (Demirtürk ve Demirdal, 2004). Enterokoklarda, sefalosporin, β -laktamlar, sulfonamide ve düşük seviyede aminoglikosid ve klindamisine karşı intrinsik antibiyotik direnci görülürken, kazanılmış direnç kloramfenikol, eritromisin, yüksek seviyede klindamisin ve aminoglikosid, tetrasiklin, yüksek seviyede β -laktamlar, fluorokinolonlar ve vankomisin gibi glikopeptidlere karşı görülmektedir (Leclercq, 1997).

Konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, Danimarka'da 1995 yılında vankomisin dirençli enterokoklar domuzlarda % 21, kanatlılarda % 56, eritromisin direnci sırasıyla % 91-59, kinupristin-dalfopristin direnci ise % 53-37 oranında bulunurken; Finlandiya'da ise eritromisin direnci domuzlarda % 18, kanatlılarda ise % 9 oranında bulunmuştur (Van den Bogaard ve Stobberingh, 2000). Danimarka'da yemlerde antibiyotik büyüme faktörlerinin yasaklanmasından önce, broiler kökenli *E. faecium* izolatlarının % 60-80'i antibiyotik büyüme faktörlerine karşı dirençli iken, yasaktan sonra bu oranın % 5-35 oranına düştüğü bildirilmiştir (Nollet, 2005).

Yapılan bir çalışmada 108 sığır kıyma örneğinin 97'si *E. faecalis*, 2'si *E. faecium*, 3'ü *E. gallinarum*, 3'ü *E. durans*, 3'ü *E. hirae* ile kontamine olduğu belirlenirken, *E. casseliflavus* ve *E. avium* saptanamamıştır. Zenginleştirme

prosedürü uygulanmadan yapılan analizlerde 555 örneğin 3'ü (% 0.5) vankomisin dirençli enterokok olarak tanımlanmıştır. 24 saat tamponlanmış peptonlu suda bekletilerek analizi yapılan 555 sığır ve domuz kıyma örneklerinin ise 46'sında (% 8.3) vankomisin direnci saptanırken, 509' unda (% 91.7) vankomisin direnci saptanamamıştır. Vankomisin direnci gözlenmeyen izolatların % 87'si *E. faecalis*, % 4'ü *E. faecium*, % 3'ü *E. casseliflavus*, % 2'si *E. gallinarum*, % 2'si *E. durans*, % 1'i *E. hirae*, % 1'inden azı ise *E. avium* olarak belirlenmiştir (Klein ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada toplanan 150 broiler ve hindi eti örneğinin % 30'unda VRE saptanırken, geriye kalan % 70'inde ise vankomisin direnci saptanamamıştır (Borgen ve ark., 2001). Yine başka bir çalışmada 129 tavuk eti örneklerinden 6'sının (% 4.7) vankomisine karşı kazanılmış dirençli, 17'sinin (% 13.2) intrinsik dirençli olduğu saptanmıştır. Bu örneklerden 7'si yüksek seviyede vankomisin direnci (MİK 64 - 128 µg/ml) göstermiştir (López ve ark., 2009).

Dünyada nozokomiyal infeksiyonlar açısından oldukça önemli bir konumda olan VRE'nin gıdalarda varlığı ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye'de ise *Enterococcus* spp.'nin tavuk ve hindi eti örneklerinde varlığı, antibiyotik direnç profilleri ve vankomisine karşı minimal inhibisyon konsantrasyonlarının belirlendiği, örneklerde baskın olan *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerindeki vankomisin direnç genlerinin yaygınlığını araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile hem nozokomiyal infeksiyonlar arasında önemli bir yere sahip, hem de gıda kaynaklı bulaşma yolları olan enterokokların Türkiye'de çeşitli hayvan etlerindeki varlığı, özellikle vankomisine dirençli serotiplerin moleküler karakterizasyonu ve antibiyotik direnç profilleri ile ilgili temel literatür bilgilerine katkıda bulunmak amaçlanmaktadır.

1.6. Peptidoglikan Sentezinde Vankomisinin Rolü ve Direnç Mekanizması

Sitoplazmada, L-alanin, rasemazı enzimi tarafından D-alanine (D-Ala) dönüşmektedir. İki molekül D-Ala, ligaz enzimiyle (Ddl enzimi) birbirine bağlanarak D-Ala-D-Ala'yı oluşturmaktadır. Oluşan D-Ala-D-Ala; UDP-N-asetilmuramil-tripeptid'e eklenerek UDP-N-asetilmuramil-pentapeptid'i ortaya

çıkarmaktadır. UDP-*N*-asetilmuramil-pentapeptid, undekaprenol lipid taşıyıcıya bağlanarak sitoplazmik membranın dış yüzeyinde translokasyonu sağlamaktadır. UDP-*N*-asetilmuramil-pentapeptid başlangıç haldeki peptidoglikan ile birleştiğinde (transglikozilasyon), yan zincirlerin peptitleri arasında çapraz köprülerin oluşumuna izin vermekte (transpeptidasyon) ve peptidoglikan zarının uzamasına neden olmaktadır (Courvalin, 2006; Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

Glikopeptid, bakteriyel sitoplazmasına girebilmemektedir ancak, sitoplazmik membranın dış yüzeyine bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe etmektedir. Buna bağlı olarak, vankomisin ve teikoplanin, UDP-*N*-asetilmuramil-pentapeptidin D-Ala-D-Ala terminaline yüksek bir afiniteyle bağlanarak peptidoglikan sentezinin transglikozilasyon aşamasını inhibe etmektedir (Courvalin, 2006; Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

Glikopeptidlere direnci; D-laktat (D-Lac) ya da D-serin (D-Ser) gibi, düşük afiniteli pentapeptit öncülerinin üretimi ve normal olarak üretilen yüksek afiniteli öncülerinin (D-Ala-D-Ala) eliminasyonu ile gerçekleşmektedir. Peptidoglikan sentezinin yeniden programlanması için gerekli olan pek çok enzim bir operon içinde organize genler tarafından kodlanmaktadır. D-Ala ile D-Lac'ın yer değiştirmesi, glikopeptid ile D-Ala-D-Ala arasında kurulan beş hidrojen bağından birinin ortadan kalkmasına ve böylece vankomisin afinitesinin yaklaşık 1000 kat azalmasına neden olmaktadır. D-Ala ile D-Ser'in yer değiştirmesi, afinitenin 7 kat azalmasına neden olmakta ve D-Ala-D-Ser bağlı vankomisin direnci daha düşük bir seviyede olmaktadır (Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

Enterokoklarda kazanılmış vankomisin direncinden *van A*, *van B*, *van C*, *van E*, *van G*, *van L*, *van M* ve *van N* olmak üzere sekiz gen ve intrinsik dirençten *van C* geni sorumlu olmaktadır. İntrinsik *van C* direnci *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* türlerinde görülmektedir. *Van A* ve *van B* direnci, çoğunlukla enterokoklarda ve bazen korineform bakteriler ve streptokoklarda tespit edilmiştir.

Aynı zamanda *van A* operonu bazen *S. aureus*'larda görülmektedir. Pozitif *van A* izolatları; vankomisine (MİK ≥ 64 mg/l) ve teikoplanine (MİK ≥ 16 mg/l) yüksek seviyede direnç göstermektedir. *Van B* pozitif izolatları ise; vankomisine değişken seviyelerde (MİK = 16-32 mg/l) dirençli olmaktadır (Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

Van A operonu genellikle *Tn3* tipi transpozon (*Tn1546*) tarafından taşınmaktadır. Glikopeptitlere karşı dirençten sorumlu olan beş gen (*van HAXYZ*) ve iki düzenleyici sistem (*van RS*), *van A* operonunda bulunmaktadır. *Van A* geni; D-Ala-D-Lac depsipeptid oluşumunu katalize eden bir ligazı kodlamaktadır. *Van A* geni tek başına dirence neden olamaz ancak doğada nadir bulunan D-Lac substratın sentezi *van A* genini dirençli hale getirmektedir. *Van H* geni tarafından kodlanan dehidrogenaz, pirüvatı düşürmektedir ve böylece ligaz için gereken D-Lac substratı sağlanmaktadır. D-Ala-D-Lac depsipeptid; penta depsipeptid oluşumuna ve bunların birleşmesi peptidoglikanı meydana getirmektedir. Bununla birlikte, yaban tip öncülerinin sentezinin devam etmesi, vankomisinin bunlara bağlanması ve hücre duvarının bozulması nedeniyle dirençli genler ortaya çıkmaktadır. Duyarlı öncülerin ortadan kaldırılması; D, D-Dipeptidazı kodlayan *van X* geni tarafından yapılmaktadır (Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

D, D-Dipeptidaz; Ddl ligazı tarafından oluşturulan D, dipeptit D-Ala-D-Ala'yı hidrolize etmektedir. Buna ek olarak, *van Y* genleri tarafından kodlanan D, D-karboksipeptidaz, D-Ala öncülerini elemine etmektedir. Benzer bir mekanizma, *van B* tipi dirençte görülmektedir. *Van B* tipi direnç operonu *Tn1547* transpozonu tarafından taşınmaktadır. *Van C* tipi direnç dışında, D-Ala-D-Ser-tipi gen kümeleri kazanılmış gen kümeleri olmaktadır. Nadiren bulunan *van E*, *van G* ve *van L* genleri sadece *E. faecalis* kromozomunda tespit edilmiştir. *Van N* geni ise *E. faecium*'un tek bir izolasyonunda bulunduğu bildirilmiştir. *Van G* ve *van N* genleri, sadece transfer edilebilir D-Ala-D-Ser direnç tiplerinde tanımlanmaktadır (Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

Bazı *van A* ve *van B* tipi dirence sahip *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları, sadece vankomisine dirençli olmakla kalmayıp aynı zamanda hayatta kalmak için vankomisin ve teikoplaninin varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Bu özellik, *ddl* genindeki mutasyonları sonucunda Ddl ligaz enziminde fonksiyonel eksikliği oluşumu nedeniyle görülmektedir. Bu türlerde, peptidoglikan sentezi; bir glikopeptit tarafından indüklenen direnç operonuna bağlı olmaktadır (Cattoir ve Leclercq 2013; Shantal ve Nagarathnamma, 2015).

1.7. Vankomisin Direncinin Regüle Olma Mekanizması

Glikopeptid direnci; iki bileşenli transdüksiyon sinyal sistemi'ne (*van S* / *van R* tipi) göre düzenlenmektedir. Bu sistem membrana bağlı histidin kinaz ve sitoplazmik yanıt regülatöründen oluşmaktadır ve bir transkripsiyon aktivatörü olarak görev yapmaktadır. *Van S* tipi sensörü; bir C-terminali sitoplazmik kinaz ve bir segmentli, iki membranlı ve N-terminali glikopeptid sensörü içermektedir (Courvalin, 2006).

Kültür ortamında bir glikopeptit varlığında bir sinyal oluşur sonra *van S*'nin sitoplazmik bölgesinde; ATP'ye bağımlı otofosforilasyonun, belirli bir histidin kalıntısında katalize olur ve fosfat grubu *van R*'nin aspartat kalıntısına transfer edilir. Glikopeptitin yokluğunda *van S*, *van R*'nin defosforilasyonunu stimüle eder (Courvalin, 2006).

Van S sensörü;

- a. indükleyici olmayan koşullar altında bir fosfataz gibi davranarak,
 - b. glikopeptid varlığında bir kinaz olarak,
 - c. yanıtı düzenleyicisinde (regülatör) fosforilasyonuna yol açarak,
 - d. ve direnç genlerinin aktifleştirilmesine neden olarak,
- van R* regülatörünün fosforilasyon seviyesinin modüle etmektedir (Courvalin, 2006).

1.8. Vankomisin Direncinin Fenotipik Tanımlanması

Fenotipik ve genotipik olarak glikopeptidlere karşı kazanmış direnç *van A*, *van B*, *van D*, *van E*, *van G*, *van L*, *van M*, ve *van N* genlerinde tanımlanırken, intrinsik direnç *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türlerin *van C* geninde belirlenmiştir. *Van A* ve *van B* genleri en sık enterokoklarda ve bazen korineform bakteriler ve streptokoklarda tespit edilmiştir. *Van A* operonu *S. aureus*'ta da belirlenmiştir (Cattoir ve Leclercq 2013; Miller ve ark., 2014).

1.8.1. Van A Tipi Direnç

Tüm glikopeptid direnç tipleri arasında en ayrıntılı olarak incelenmiş *van A* tipi direnç; vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençten sorumlu olmaktadır. Bu dirençten 10.581 bp'lik *Tn1546* ve *Tn5482* transpozonun üzerinde taşınan *van A* gen kümesinin sorumlu olduğu saptanmıştır. *Van A* gen kümesinin hem transfer edilebilen hem transfer edilemeyen plazmidler ve bakteriyel kromozomlar üzerinde bulunabildiği bildirilmiştir. *Van A* gen kümesi ilk olarak *E. faecium*'un *Tn1546* ve *Tn5482* transpozonunda tanımlanmıştır. Ayrıca bu gen kümesi *E. faecalis*'te de bulunmuştur *Van A* geni çoğunlukla *E. faecium* ve *E. faecalis*, aynı zamanda *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde de tanımlanmıştır (Mirzaei ve ark., 2015).

Van A tipi direnç genini; farklı fonksiyonlarına sahip 9 polipeptit kodlamaktadır. *ORF1* ve *ORF2*; genlerin aktarılmasına, *van R* ve *van S*; direnç genlerinin regüle olmasına, *van H* ve *van A*; D-Ala-D-Lac depsipeptid sentezine, *van X* ve *van Y*; peptidoglikan öncüleri hidrolizine neden olmaktadır. *Van Z*'nin işlevi bilinmemektedir (Mundy ve ark, 2000; Garrido ve ark., 2014).

Van A proteini; substrat spesifikliğinini değişmesini sağlayan ve D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Lac oluşumuna neden olan bir ligazdır. Ancak vankomisine duyarlı olan normal D-Ala-D-Ala prekürsörü, ortamda bulunduğu sürece D-Ala-

D-Lac sentezi, yüksek düzeyde vankomisin direnci oluşturmak için yeterli değildir (Miller ve ark., 2014; Garrido ve ark., 2014).

Peptidoglikanın artması ile öncü maddelerin arasındaki çapraz bağlantının, penisilin bağlayıcı protein 5'ler (PBP5) tarafından gerçekleştirildiği bildirilmektedir. D-Lac ve D-Ala'nın yer değiştirmesi, bu bağlantıyı etkilememektedir. Van A direnci uyarılabilir olduğu için PBP'lerdeki değişim sadece vankomisinin varlığında gerçekleşmekte ve β -laktamlara karşı yüksek dercede duyarlılık görülmektedir. Bu etki vankomisine dirençli suşlara karşı kullanılan iki gruptaki etken maddelerin kombinasyonlarının oluşturduğu sinerjiyi belirtmektedir. Yine PBP'lerin yüksek moleküler ağırlıkları, β -laktamlara daha yüksek bir afiniteleri olmasına neden olmaktadır (Cetinkaya ve ark., 2000).

Klinik çalışmalarına göre *E. faecium*'da; ampisilin, penisilin bağlayıcı protein 5 ve vankomisin arasında genetik bağlantısı olduğu belirtilmiştir. Buna bağlı olarak sefalosporinler gibi beta-laktam öncülerine sahip antimikrobiyal ajanlar vankomisine direncinin ortaya çıkmasında katkıda bulundukları bildirilmiştir. Beta-laktam dirençli penisilin bağlayıcı protein ve vankomisin direncinin arasında bağlantı olduğu vankomisine dirençli *E. faecalis*'lerde saptanmıştır (Mundy ve ark., 2000).

1.8.2. Van B Tipi Direnç

Enterokoklarda van B tipi glikopeptid direnci; *van A* ligaza yapısal benzerlik gösteren, *van B* ligaz tarafından oluşmaktadır. *Van B* proteini, D-Ala-D-Lac ile sonlanan pentadepsipeptidin oluşumuna neden olmaktadır. *Van HB*, *XB*, *YB*, *RB*, *SB* genleri *van A* direnciyle benzerlik göstermektedir. D,D-dipeptidaz aktivitesi (*van XB*) ile vankomisine direnç düzeylerinin arasında bağlantı olduğu saptanmıştır. *Van Z* geni, *van B* direncine sahip mikroorganizmalarda bulunmamaktadır. *Van YB* tüm izolatlarda bulunmamakta ve *Tn1546* transpozon üzerinde bulunduğu pozisyonunda farklılık göstermektedir. *Van HAX* ile *van HBBXB* arasında % 70 sekans benzerliği olmasına rağmen *van A* ve *van B*'lerin

RS ve Y proteinleri arasında daha az (% 25-35) benzerlik bulunmaktadır. Sadece *van B* geninde bulunan, *van W* proteinin işlevi bilinmemektedir. *Van B* gen kümesi *van B-1*, *van B-2* ve *van B-3* olarak üç farklı altgrubuna ayrılmaktadır. *Van B* altgrupları ve vankomisine direnç düzeyi arasında bir bağlantı olmadığı belirlenmektedir (Courvalin, 2006; Garrido ve ark., 2014).

Van B gen kümesi kromozom üzerine yerleşmektedir. Ancak transpozon ve plazmidler tarafından da taşınabildikleri bildirilmiştir. *Van B* gen kümeleri genellikle 90-250-kb'lik elemanları tarafından kromozomdan kromozoma konjugasyon ile transfer edilmektedir (Courvalin, 2006).

Van B tipi direncin transferi; en çok *Tn916* gibi konjugatif transposonlarla taşınan *van B2* gen kümelerin yayılımı ile görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da 27 kb'lik *Tn5382* ve 34 kb'lik *Tn1549* tranpozonlar tarafından yayılan *van B* direnç yaygın olarak tespit edilmiştir (Gold, 2001; Courvalin, 2006).

Van B tipi direnç taşıyan enterokok izolatları vankomisine değişken düzeyde direnç gösterirken teikoplanine duyarlı olmaktadır. *Van B* tipi direnç yaygın olarak *E. faecalis* ve *E. faecium*'da görülmektedir. *Van RB – van SB* sistemi vankomisin tarafından indüklenirken teikoplanin tarafından indüklenmez. Bu nedenle *van B* tipi direnç taşıyan suşlar teikoplanine duyarlı olmaktadır. *Van B* izolatlarının vankomisin tarafından indüklenmesi sonucunda teikoplanine de direnç geliştiği bildirilmiştir (Hollenbeck ve Rice 2012; Miller ve ark., 2014).

1.8.3. Van C Tipi Direnç

Van C tipi direnç; *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* türlerinde görülen intrensik bir direnç tipidir. Vankomisine düşük düzeyde dirençli, teikoplanine ise duyarlı olmak bu tip dirençte görülmektedir. Bu dirençte; *van C-1*, *van C-2* ve *van C-3* olmak üzere üç alt tipinin bulunduğu tespit edilmiştir. *Van C-1* *E. gallinarum*'da, *van C-2* *E. casseliflavus*'ta, *van C-3* ise *E. flavescens*'te

bulunduğu saptanmıştır (Cetinkaya ve ark., 2000; Sujatha ve Praharaj 2012; Mazaheri Nezhad Fard ve ark., 2014).

Van C direnç fenotipi; yapısal olarak D-Ser ile sonlanan peptidoglikan öncülerinin üretimi sonucu ifade edilmektedir. D-Ala-D-Ser ile sonlanan pentepeptid üç *van C* geni tarafından kodlanmaktadır. *Van C*-1, *van C*-2 ve *van C*-3 genleri kromozomalar üzerine bulundukları, transfer edilmedikleri ve *van A*, *van B* ve *van D* genlerinden farklı oldukları bildirilmiştir. (Cetinkaya ve ark., 2000; Courvalin, 2006). Van C tipi direnci için üç proteinin olması (*van T*, *van C*, *van XY_C*) gereklidir (Miller ve ark., 2014).

1.8.4. Van D Tipi Direnç

Kazanılmış van D tipi direnç; D-Ala-D-Lac ile sonlanan peptidoglikan üretimi nedeniyle oluşmaktadır. İncelenmiş enterokok türlerinde kromozom üzerinde yer alan *van D* geni, *van A* ve *van B*'ye benzer olduğu düşünülmektedir. Ancak *van D* geni, konjugasyonla enterokok türleri arasında transfer edilemediği için *van A* ve *van B*'den ayırıt edilmektedir. *Van D* geni; *van A* ve *van B* gen kümelerinde bulunan *van Z* ve *van W* genleri ile homolog olmadığı belirtilmiştir (Courvalin, 2006; Miller ve ark., 2014). *Van D* gen kümesi; *van R_D*, *van S_D*, *van RY_D*, *van H_D*, *van D* ve *van X_D* olmak üzere altı geni içermektedir (Méndez-Álvarez ve ark., 2000).

Van D tipi dirençte; D, D-dipeptidaz aktivitesi görülmemektedir. Ayrıca D-Ala-D-Ala ile sonlanan peptidoglikan öncülerinin ortadan kaldırılması *van D* tipi duyarlı fenotipler (bakteriler) tarafından mümkün olmadığı bildirilmiştir. Duyarlı *van D* tipi fenotiplerin aksine, *van D* tipi direnç suşlarında, kromozomal *ddl* genindeki çeşitli mutasyonlar sonucunda *ddl* inaktif hale gelmektedir. Bir noktada mutasyonuda; 5-bp veya IS19 gibi elementlerin yerleştirilmesi sonucunda genlerin aktivitesi bozulabilmektedir (Courvalin, 2006; Miller ve ark., 2014).

1.8.5. Van E Tipi Direnç

D-Ala-D-Ser ile sonlanan peptidoglikan öncülerinin sentezi nedeniyle bu tip direnç interinsik olarak enterokok türlerinde ortaya çıkmaktadır. Bu direnç tipi ilk olarak *E. faecalis* BM4405'te tanımlanmıştır. Bu tip direnç izolatları; vankomisine karşı düşük düzeyde dirençli (MİK=16 µg/ml), teikoplanine ise duyarlı oldukları (MİK=0.5 µg/ml) bildirilmiştir (Méndez-Álvarez ve ark., 2000; Courvalin, 2006).

Van E geni, *E. faecalis*'te kromozom üzerinde lokalize olmaktadır (Cattoir ve Leclercq 2013). Bu direnç genotipinin; van C tipi direnç ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Çetinkaya ve ark., 2000; Courvalin, 2006). Aminoasit sekanslamalarında van C'ye % 55, van A'ya % 45, van B'ye % 43 ve van D'ye % 44 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2000).

1.8.6. Van G Tipi Direnç

Kazanılmış van G tipi direnç izolatları; vankomisine düşük düzeyde (MİK=16 µg/ml) direnç gösterirken, teikoplanine (MİK= 0.5 µg/ml) duyarlı olmaktadır. D-Ala-D-Ser ile sonlanan peptidoglikan öncülerinin sentezi nedeniyle bu tip direnç görülmektedir. Kromozom üzerinde bulunan van G operonu yedi gen içermektedir ve bu genleri çeşitli van operonlarından toplamaktadır (McKessar ve ark., 2000; Depardieu ve ark., 2003; Boyd ve ark., 2006; Courvalin, 2006).

Diğer van operonlarının aksine, van G tipi dirençte tespit edilen P_{UG} düzenleyici sistemi, van G gen kümesinde bulunan üç gen ($van U_G$, $van R_G$, $van S_G$) tarafından kodlanmaktadır. $van R_G$ ve $van S_G$ genleri $van R_D$ ve $van S_D$ genlerine yüksek düzeyde benzerlik göstermektedirler. $van U_G$ genini ise, bir transkripsiyonel aktivatör kodlamaktadır. P_{YG} düzenleyici sistemi ise, van G gen kümesinde bulunan 5 gen ($van Y_G$, $van W_G$, $van G$, $van XY_G$ ve $van T_G$) tarafından kodlanmaktadır. Bu tür bir protein, daha önce glikopeptid direncinde bulunmadığı belirtilmiştir. Van G tipi direnç; ~240 kb'lık genetik elementleri tarafından kromozomdan kromozoma transfer edilebilmektedir. Ayrıca eritromisin direncini

kodlayan *erm* B genide bu elementler tarafından taşınmaktadır (Depardieu ve ark., 2003; Boyd ve ark., 2006; Courvalin, 2006).

1.9. Enterokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Staphylococcus aureus, koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *Enterococcus* gibi birçok farklı bakteri, virüs, mantar ve parazitler nozokomiyal infeksiyonlara (Health care-associated infections, HAI) neden olabilmektedir (Anon, 2002b; Anon, 2011a). En yaygın nozokomiyal infeksiyonlar; cerrahi operasyon, yara, üriner sistem ve solunum yolu infeksiyonlarıdır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, World Health Organization, WHO) cerrahi, ortopedi ve yoğun bakım ünitelerinde hastane kökenli infeksiyonların yaygın olduğunu bildirmektedir (Anon, 2002b).

Enterokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisi için, genellikle vankomisin kullanılmaktadır. Bazı durumlarda, enterokoklar bu ilaca dirençli olmakta bunlara vankomisin dirençli enterokok (VRE) denilmektedir. VRE infeksiyonlarının çoğu hastanelerde oluşmaktadır. VRE'ler hastalık oluşturmada, insan bağırsak ve genital sisteminde kolonize olabilmektedir. Ancak, bazen kateter kullanımı veya cerrahi girişimler gibi durumlarda üriner sistem, kan dolaşım ve yara infeksiyonlarına neden olabilmektedirler (Anon, 2011a).

Gıda değeri olan hayvanlarda antimikrobiyal ajanların kullanımı ile insanlarda antimikrobiyal dirençli bakterilerin ortaya çıkabildiği belirtilmektedir. Buna örnek olarak *Salmonella*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* bakterileri örnek olarak verilebilmektedir. Bu dirençli bakteriler gıda tüketimi ve hayvan gübresi ile temas sonucu insanlara geçebilmektedir. Moleküler yöntemler ile gıda değeri olan hayvanlarda antimikrobiyal ajanların kullanımı ve insanlardan izole edilen antimikrobiyal dirençli enterokoklar arasında ilişki olduğu rapor edilmektedir (Anon, 2003).

Enterokok kaynaklı nozokomiyal infeksiyonların gelişimini etkileyen faktörler ise; daha önce uzun süre vankomisin veya diğer antibiyotiklerle tedavi

edilmiş kişilerde, VRE'lerin kolonize olması, organ nakli olanlar, abdominal veya göğüs cerrahisi geçirenler, üriner veya intravenöz (IV) katater gibi tıbbi cihazların kullanılması olmaktadır (Anon, 2002b; Anon, 2011a). DSÖ'ye göre; kalabalık hastane popülasyonları arasında antibiyotik dirençli bakterilerin transferi, kanser, diyabet, böbrek yetmezliği ve AIDS gibi hastalarda bağışıklık sistemin baskılanması, çocukluk ve yaşlılık çağında enfeksiyona karşı direncin azalması ve enfeksiyon kontrol programlarının yeterli yapılmaması gibi faktörler nozokomiyal enfeksiyonların gelişimini etkilemektedir (Anon, 2002b). Ayrıca hastanın kendi florasında bulunan enterokoklardan (endojen enfeksiyon), hasta kişilerle temas sonucu (çapraz enfeksiyon) ve kontamine yüzeylerden (çevresel enfeksiyon) enfeksiyon oluşabilmektedir (Anon, 2002b).

VRE kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde; antibiyotik tedavisine başlamadan önce mikrobiyolojik örnek alınması ve kültür sonuçlarının izlenmesi, gereksiz antibiyotik kullanımını azaltmak için yararlı olmaktadır. Antibiyotik direnci ve antibiyotik kullanım verilerinin izlenmesi ağır hastalarda antibiyotik tedavinin yönlendirilmesinde önemlidir. Cerrahi müdahalelerde ise, antibiyotiklerin uygun zaman ve dozlarda verilmesi dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını azaltmaktadır. VRE enfeksiyonlarının çoğu vankomisin dışındaki antibiyotikler ile tedavi edilebilmektedir (Anon, 2002b; Anon, 2005).

Enterokoklar; bakteriyemi, endokardit, menenjit, üriner sistemi, intraabdominal, neonatal, gastrointestinal, yara ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Chenoweth ve Schaberg, 1990; Jett ve ark., 1994; Zeana ve ark., 2001; McDonald ve ark., 2005; Zirakzadeh ve Patel, 2006; Tarchini, 2010; Moses ve ark., 2012).

1.9.1. Gastrointestinal Enfeksiyonlar

Enterokoklar insan ve çiftlik hayvanlarının doğal bağırsak florasında bulunmaları, klinik enfeksiyonlarda etkili olmaları ve antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç nedeniyle gıda kaynaklı patojenler olarak görülebilmektedirler. Enterokoklar

fırsatçı patojenlerdir ve genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış ya da ciddi hastalığı olan insanlarda infeksiyonlara neden olabilmektedirler. Enterokokların antibiyotiklere karşı doğal ve kazanılmış direnci patogenezin gelişiminde önemli bir faktör olmaktadır. Bu bakteriler konak dokularda kolonizasyon, adezyon, invazyon ve savunma mekanizmalarına karşı direnç nedeniyle de infeksiyonlara sebep olmaktadır. Ayrıca inflamasyona yol açarak patolojik değişiklikler neden olmaktadır. Enterokokların kolonize olabilmeleri için, AF ve ESP gibi faktörlerin yardımıyla konak hücrelerine bağlanmaları gerekmektedir (Franz ve ark., 2003).

AF; nötrofil, makrofaj, bağırsak epitel hücreleri, fibronektin, trombospondin, vitronektin ve kollajen tip I gibi ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanabilmektedir. Enterokoklar bağırsak veya ürogenital epitellerinden geçip lenfatik veya vasküler sisteme girerek abdominal infeksiyon ve bakteriyemiye neden olmaktadır. İntestinal lezyonlar gibi durumlarda, ekstraselüler matriks proteinlerine bağlı kalma yeteneğini bakteriyel translokasyonu teşvik etmektedir. Ekstraselüler matriks proteinlerine bağlılığın yara infeksiyonu ve bakteriyel endokarditte önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Süßmuth ve ark., 2000; Rozdzinski ve ark., 2001).

ESP, kromozomda kodlanan diğer adezyondur. ESP varlığında, hücre hidrofobisitesi, abiyotik yüzeylere bağlanma ve biyofilm oluşumunun arttığı bildirilmektedir. Ayrıca konak dokularda ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanarak bakterilerin kolonizasyonunu arttırmaktadır (Toledo-Arana ve ark., 2001).

AF, doku hücrelerinde hem adezyon hem invazyonda rol oynamaktadır. Enterokoklar AF yardımıyla bağırsak mukozasından göç ederek mezenterik lenf bezleri, karaciğer ve dalakta yayılmaktadır. AF, makrofajlar ve nötrofiller gibi immün hücrelere bağlanarak enterokokların intrasellüler savunmasını arttırmaktadır. Enterokoklarda; ESP, MSCRAMM ve sitolizin üretimi, bakterilerin immun yanıtı kaçınmasını sağlamaktadır (Franz ve ark., 2003).

Enterokokal bakteriyeminin kaynağı olarak üriner sistem, intravasküler kateter, intraabdominal bölge, gastrointestinal sistem, safra, pelvik ve yara infeksiyonları olarak bildirilmektedir (Murray, 1990). Enterokok bakteriyemisi gelişimi ile bakteriyemi öncesi antimikrobiyel madde kullanımı ilişkisi de araştırılmıştır. Kullanılan antibiyotikler özellikle gastrointestinal sistemde, enterokoklar dışında bulunan mikroorganizmaların üremesini baskılayarak, enterokokların artışına ve diğer faktörlerle bakteriyemi gelişimine zemin hazırlamaktadır (Montecalvo ve ark., 1994).

1.10. Enterokokların Gıdalarda Bulunuşu

Enterokokların primer konaklarını insan ve hayvanların bağırsak kanalı oluşturmaktadır. Isıya karşı relatif dirençli olan enterokoklar, klasik süt pastörizasyonunda canlılıklarını korumaktadırlar. Enterokokların gıdalarda oluşturduğu riskin önemi gıdanın türü kadar, görmüş olduğu işlemle de ilişkilidir. Düşük enterokok sayım sonuçları işlem görmemiş gıdalar için önemsiz kabul edilirken dondurulmuş, pişirilmiş veya işlem görmüş diğer bazı gıdalarda önemli olabilmektedir. Yetersiz sanitasyon uygulamaları nedeni ile enterokoklar, işletmelerde alet ve ekipmanların yüzeylerinde yerleşik flora haline gelerek buralardan gıdalara bulaşabilmektedirler. Enterokoklar diğer pek çok laktik asit bakterileri gibi ısıl işlem görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olma özelliğinden dolayı konserve ve kürlenmiş et ürünlerinde canlı kalarak ya da dilimleme ve paketlenme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak üründe bozulma yapabilmektedirler. Ayrıca enterokoklar fermente gıdalarda kontaminasyon düzeyini ya da kürlenme işleminin yetersizliğini de yansıtmaktadır (Giraffa, 2002; Majhenič, 2006).

Enterokokların ısıya yüksek dirençliliğinden dolayı bu bakteri, uygulanan ısı işleminin etkinliğinin belirlenmesinde, sanitasyonda ve muhtemel fekal bulaşma ile gıdanın genel mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde indeks bakteri olarak değerlendirilmektedir. Enterokokların çoğu dondurma işlemine karşı da relatif dirençlidir. Bu bakteriler dondurma ve donmuş muhafaza işleminde fekal indikatör

olarak değerlendirilmektedir. Diğer taraftan fermente et ve süt ürünleri de enterokokları değişik düzeylerde içermekte ve bu ürünlerde enterokoklar hijyenik yönden sorun oluşturmaktadır. Bu tip gıdalarda enterokokların varlığı fekal bir bulaşmanın göstergesi olmadığından indikatör olarak değerlendirilmemektedir (Erol, 2007).

Çoğu araştırmacı, gıda kaynaklı enteritislerde enterokokların rolünü tartışmalı bulamakta ve fırsatçı veya potansiyel patojen olarak değerlendirmektedir. Bu kapsamda gönüllüler üzerinde yapılan ve çok sayıda (10^6 - 10^9 kob/gr) bakterinin verildiği deneysel çalışmalarda semptomların şekillenmediği bildirilmektedir. Ancak bu bakterinin bazı suşlarının enteritise neden olabildiği de bilinmektedir (Erol, 2007).

Bu bakteriler istenmeyen özelliklerinin yanında sahip oldukları pek çok yararlı özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde probiyotik, starter veya ek starter olarak kullanılmaktadır. Isıya direnci ve üreme koşullarına adapte olabilme yeteneği (sıcaklık, pH değerleri ve tuz derişimleri) enterokokların peynir ve et ürünleri gibi fermente gıdaların mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmasını sağlamaktadır. Fermente gıdaların organoleptik özelliklerine katılması ve bakteriyosin (enterosin) üretim yetenekleri enterokokların gıda teknolojisinde kullanımı açısından önem taşımaktadır (Majhenič, 2006).

Enterokokların oluşturdukları enterosinlerin kullanımı, sucuk fermentasyonunda ve dilimlenmiş vakum paketli pişmiş et ürünlerinde *L. monocytogenes*'in önlenmesinde yarar sağlamaktadır. Ayrıca enterosin kimyasal koruyuculara alternatif olarak et ürünlerinde patojenlerin kontrolü için kullanılabilir (Majhenič, 2006).

Enterokokların starter olarak kullanımının, starter olmayan diğer laktik asit bakterilerinin üremesini olumlu yönde etkilediği, proteolitik indeksi ve serbest amino grubu derişimini arttırdığı, suda çözünabilir azot fraksiyonların zenginleştirdiği, tat, aroma, renk, yapı ve tüm duyuşsal özellikleri olumlu yönde

etkilediği belirtilmiştir. Bunlara ilaveten enterokoklar peynirlerde bakteriyosin oluşturarak *L. monocytogenes* gibi patojenleri inhibe etmektedirler (Franz ve ark., 1999; Majhenič, 2006).

Yapılan bir çalışmada, yemek kantinlerinden toplanan gıda, tabak ve el bezlerinde *E. faecalis* varlığı incelenmiştir. Toplanan 537 örnekten 658 *E. faecalis* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların %71.30'u kloksasiline, % 70.21'i eritromisine, % 68.54'ü kotrimoksazola, % 65.05'i amoksisiline, % 65.05'i kloramfenikole, % 63.68'i tetrasikline, % 61.70'i augmentin, % 53.04'ü gentamisine, % 11.7'si vankomisine, % 34.4'ü levofloksasine, % 28.72'i siprofloksasine, % 26.6'sı norfloksasine, % 24.92'si sparfloksasine ve % 24.32'si perfloksasine direçli oldukları saptanmıştır. İzolatların % 99.2'si 3 ila 12 antibiyotiğe birden dirençli oldukları bildirilmiştir (Olawale ve ark., 2015).

1.10.1. Et Ürünlerinde Enterokokların Varlığı

Entrokoklar olumsuz çevre koşulları ve ısıya dirençli oldukları için, gıda güvenliği ve kalitesinin indeksi olarak düşünülmektedir. Hayvanların gastrointestinal sisteminde enterokokların varlığı kesim sırasında etin kontamine olmasına yol açabilmektedir. Çiğ et ve ürünleri üzerinde yapılan çalışmalarda, sığır ve domuz etlerinden *E. faecalis* baskın tür olarak, *E. faecium*'un ise sıklıkla işlem görmüş paket sosislerden izole edildiği bildirilmiştir (Franz ve ark., 1999; Foulquié Moreno ve ark., 2006). Üç farklı kesimhaneden toplanan domuz karkaslarında *E. faecium* ve *E. faecalis*, yapılan bir başka çalışmada tavuk örneklerinde ise *E. faecalis* baskın tür olarak izole edilmiştir (Franz ve ark., 2003).

Entrokoklar pH, tuz ve ısıya dirençlidir. Bu nedenle, pişmiş ve işlem görmüş etlerde bozulmaya neden olabilmektedir. Örneğin, salam ve Landjager gibi et ürünlerinde enterokoklar 10^2 - 10^5 kob/g düzeyinde değişmektedir (Giraffa, 2002). Entrokoklar İspanya'da üretilmiş Chorizo ve Espetec gibi kuru fermente sosislerden de izole edilmiştir (Franz ve ark., 2003). Ayrıca ısı işleminden sonra konserve jambon ve paketlenmiş kefal etlerinden *E. faecalis* ve *E. faecium* izole

edilmiştir. Konseve ürünlerde entrokokların tuz ve nitrit tarafından etkilendikleri bildirilmiştir. İşlem görmüş etlerin bozulmasını önlemek için, entrokoklar tarafından başlangıç kontaminasyonu minimum düzeyde tutulmalı ve yeterli sıcaklık işlemi uygulanmalıdır (Franz ve ark., 1999).

Japonya’da yapılan bir çalışmada; 102 tavuk eti ve 54 sakatat örneğinde *Enterococcus* spp. ve antibiyotik direnç profillerin varlığı incelenmiştir. Bu örneklerden 113 *E. faecalis* ve 25 *E. faecium* izolatu elde edilmiştir. Toplam 113 *E. faecalis* izolatının % 58.4’ü oksitetrasikline, % 50.4’ü dihidrostreptomisine, % 37.2’si eritromisine, % 6.2’si kloramfenikole, % 2.7’si enrofloksasine, % 0.9’u vankomisine dirençli oldukları tespit edilmiştir. Toplam 25 *E. faecium* izolatının % 4’ü ampisiline, % 28’i oksitetrasikline, % 20’si dihidrostreptomisine, % 4.4’ü eritromisine, % 32’si enrofloksasine, % 4’ü vankomisine, % 12’si virginamisine dirençli oldukları saptanmıştır (Hidano ve ark., 2015).

Yapılan başka bir çalışmada kanatlı karkaslarından elde edilen toplam 75 *E. cecorum* izolatının % 72’si linkomisine ve % 61.3’ü tetrasikline dirençli oldukları saptanmıştır. *E. cecorum* izolatlarının; % 1.3’ü kloramfenikole, % 22.7’si eritromisine, % 1.3’ü gentamisine, % 12’si kanamisine, % 72’si linkomisine, % 16.7’si streptomisine, % 73.3’ü tetrasikline ve % 6.7’si tilosine dirençli oldukları tespit edilmiştir. Aynı zamanda; *E. cecorum* izolatlarının % 70.7’si 2 ve üzeri antibiyotiğe birden dirençli oldukları bildirilmiştir (Jackson ve ark., 2015).

Yapılan bir başka çalışmada; peynir, sığır ve tavuk eti örneklerinden 102 *Enterococcus* spp. izolatu elde edilmiştir. Bu entrokok izolatlarının 48’i sığır eti, 40’i tavuk eti ve 14’ü peynir örneklerine ait oldukları bildirilmiştir. PCR tekniği ile toplam 102 *Enterococcus* spp. izolatının 70’i vankomisin dirençli *E. faecium* olduğu saptanmıştır. Vankomisin dirençli *E. faecium* izolatlarının 35’i sığır eti, 27’si tavuk eti, 8’i peynir örneklerine ait oldukları ve hepsinde *van A* geninin bulunduğu belirlenmiştir. Vankomisin dirençli *E. faecium* izolatlarının; % 100’ü siprofloksasin, eritromisin ve ampisiline, % 95’i gentamisine, % 5’i kloramfenikole dirençli oldukları saptanmıştır (Talebi ve ark., 2015).

Yapılan başka bir çalışmada 500 sığır, domuz ve tavuk eti örneğinde ve 100 yumurta örneğinde vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) incelenmiştir. Bu örneklerin 141'inde *Enterococcus* spp. saptanmıştır. Toplam 141 enterokok izolatının 88'i *E. faecium* ve 53'ü *E. faecalis* olarak belirlenmiştir. *Enterococcus* spp. izolatlarının % 66'sı ampiciline, % 52.5'i siprofloksasine, % 51.8'i eritromisine, % 41.8'i penisiline, % 36.9'u tetrasikline dirençli oldukları gözlenmiştir. İzolatların % 15.6'sı tüm antibiyotiklere duyarlı ve % 53.2'si multirezistans oldukları saptanmıştır. *E. faecium* izolatlarının % 34.1'i ve *E. faecalis* izolatlarının % 1.9'u vankomisine direnç gösterdikleri belirlenmiştir. Vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarının 22'sinde *van A* geni, 2'sinde *van B* geni, 7'sinde hem *van A* hem *van B* geni saptanmıştır. *E. faecalis* izolatlarında ise *van A* ve *van B* geni bulunmamıştır (Gousia ve ark., 2015).

Ankara'da yapılan bir çalışmada 2007 yılı ocak-haziran ayları arasında farklı marketlerden toplanan 200 et, peynir, hazır yemek, baharat ve yoğurt örnekleri incelenmiştir. Bu çalışmada çeşitli gıda örneği enterokoklarla kontaminasyon oranları Çizelge 1.4'te verilmiştir (Koluman ve ark., 2009).

Çizelge 1.4. Çeşitli gıda örneklerinin enterokoklarla kontaminasyon oranları (Koluman ve ark., 2009).

Gıda örnekleri		Örneklerin sayısı	Enterokok kontaminasyonu
Et n=50	sığır	25	% 88
	tavuk	25	% 72
Peynir n=50	çedar	20	% 60
	türk beyaz	20	% 70
	krem	10	% 60
Hazır yemek n=50	hamburger	10	0
	pizza	10	0
	tavuk nugget	10	% 20
	sütlü tatlı	10	% 10
	sığır eti kızartması	5	0
	salata	5	0
Baharat n=30	karabiber	10	% 80
	kırmızı biber	10	% 70
	köri	10	% 50
Yoğurt		20	% 25

Ankara’da yapılan başka bir çalışmada tavuk mezbahalarından toplanan 106 tavuk boyun derisi örneğinde enterokokların varlığı incelenmiştir. İncelenen örneklerin 83’ünde (% 78) *Enterococcus* spp. izole edilmiştir. *Enterococcus* pozitif izolatlarının % 48’i *E. faecium*, % 23’ü *E. durans*, % 19’u *E. faecalis*, % 6’sı *E. gallinarum*, % 1’i *E. hirae*, % 1’i *E. mundtii* ve % 1’i *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır (Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010).

Adana’da yapılan bir çalışmada çeşitli marketlerden toplanan 50 tavuk eti örneğinde 4 enterokok, 22 koagülaz negatif stafilokok ve 4 *S. aureus* suşu izole edilmiştir. *Enterococcus* spp. izolatların % 50’si eritromisine, % 100’ü tetrasikline, % 50’si vankomisine, % 50’si kloramfenikole, % 75’i siprofloksasine dirençliken izolatların hepsinin teikoplanine duyarlı oldukları bildirilmiştir (Yurdakul ve ark., 2013).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada Ankara’da farklı marketlerde taze olarak satışa sunulan toplam 100 hindi kuşbaşı örneği materyal olarak kullanılmıştır. Bu örnekler; Eylül, Ekim, Kasım, Aralık ve Ocak aylarında toplamda 2 farklı marka ve 8 açıkta dökme satış noktalarından alınmıştır ve bunların hepsine 1-10’a kadar firma ismi verilmiştir. Paketlenmiş alınan örnekler orjinal ambalajlarında, açıkta dökme satış noktalarından alınan örnekler ise satış noktasında paketlenildiği şekilde soğuk zincir altında 2 saat içerisinde laboratuvara getirilerek analiz edilmiştir.

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

2.1.1.1. Tamponlanmış Peptonlu Su

Buffered Peptone Water, TPS (Oxoid, CM0009)

Bileşim	gram/litre
Peptone	10.0
NaCl	5.0
Di-sodium phosphate	3.5
Potassium dihydrogen phosphate	1.5
pH 7.2 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Klasik kültür kullanılmak üzere, hazır besiyerinden 20 gram tartılarak 1 litre distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7.2± 0.2’ye ayarlandıktan sonra 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklav edildi. Otoklavdan çıkan hazırlanmış besiyeri oda sıcaklığına ulaştığında + 4°C’de muhafaza edildi.

2.1.1.2. Slanetz–Bartley Agar

Slanetz–Bartley Agar (Oxoid, CM0377A)

Bileşim	gram/litre
Tryptose	20.0
Yeast extract	5.0
Glucose	2.0
K ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	4.0
Sodium azide	0.4
Tetrazolium chloride	0.1
Agar	10.0

pH 7.2 ± 0.2	
------------------	--

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 42 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü. pH değeri kontrol edildi. Uygun pH aralığı (7.2 ± 0.2) ayarlandıktan sonra sıcak Su banyosunda homojen bir şekile gelene kadar bırakıldı. Homojen ve şeffaf hale geldikten sonra steril petriler içerisine besiyer döküldü. Oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekleyen besiyerleri + 4°C’de muhafaza edildi.

2.1.1.3. % 0.6 Maya Ekstraktı İçeren Tryptone Soya Agar

- Tryptone Soya Agar, TSA (Oxoid CM0131)

Bileşim	gram/litre
Pancreatic digest of casein	15.0
Enzymatic digest of soya bean	5.0
Sodium chloride	5.0
Agar	15.0
pH 7.3 ± 0.2	

- Yeast Extract Agar, (Oxoid, LP0021B)

Bileşim	gram/litre
Yeast extract	3.0
Peptone	5.0
Agar	15.0
pH 6.5 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Elde edilen izolatları 4°C’de muhafaza etmek için, hazır besiyerinden 40 gram ve maya ekstraktı 6 gram tartılarak 1 litre distile suda çözündürüldü ve pH değeri 7.3 ± 0.2 ’ye ayarlandıktan sonra sıcak Su banyosunda iyice eritildi. Daha sonra 16 x 150 mm tüplere 9 ml olacak şekilde paylaştırılarak 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edildikten sonra yatık bir pozisyona getirilerek katılaşması sağlandı ve yatık agar elde edildi. Sonra tüpler + 4°C’de muhafaza edildi.

2.1.2. *Enterococcus* spp. İdentifikasyonu Amacıyla Kullanılan Besiyerler ve Kimyasal Maddeler

2.1.2.1. Brain Heart Infusion Broth

BHI, Broth, (Oxoid CM1135B)

Bileşim	gram/litre
Calf brain infusion solids	12.5
Beef heart infusion solids	5.0
Proteose peptone	10.0
Glucose	2.0
Sodium chloride	5.0
Di-sodium phosphate	2.5
pH 7.4 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 37 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyerinin pH değeri kontrol edildi. Uygun pH aralığı (7.4 ± 0.2) ayarlanan besiyeri 16x150 mm tüplere 9 ml olacak şekilde dolduruldu. Tüpler 121°C 'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan tüpler oda sıcaklığına ulaştığında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.1.2.2. % 30'luk Hidrojen Peroksit

H_2O_2 (Merck 1.08597.1000) % 30'luk

Hazırlanışı:

Kimyasal analizler amacıyla kullanılan % 30'luk H_2O_2 'den 3 ml alınarak solüsyonun % 3'lük olması amacıyla 27 ml distile su ilave edildi. Solüsyon $+4^{\circ}\text{C}$ 'de maksimum 2 gün muhafaza edildi.

2.1.2.3. % 6.5'luk NaCl içeren MRS Agar (pH'sı 9.6)

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

Bileşim	gram/litre
Peptone	10.0
Lab-Lemco Powder	8.0
Yeast extract	4.0
Glucose	20.0
Sorbitan mono-oleate	1ml
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0
Sodium acetate 3H ₂ O	5.0
Tri-ammonium citrate	2.0
Magnesium sulphate 7H ₂ O	0.2
Manganese sulphate 4H ₂ O	0.05
Agar	10.0
pH 6.2 ± 0.2	

- NaCl (Oxoid/Remel, LP 005 B)

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 62 gram ve NaCl'den 65 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan besiyerinin pH değeri hazırlanan NaOH ile kontrol edildi. Uygun pH aralığı (9.6) ayarlandıktan sonra sıcak Su banyosunda iyice eritildi. Daha sonra 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45-50°C'ye soğuduğunda sonra besiyerinden yaklaşık 12 ml steril petrilere dökülerek oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletildi. Sonra + 4°C'de muhafaza edildi.

- AnaeroGen Gaz Kitleri (Oxoid, AN0025A; AN0035a)

Anaerob ortam sağlanması amacıyla AnaeroGen (Oxoid AN 0025 A ve AN 0035 A) ticari gaz kitleri kullanıldı.

2.1.2.4. SIM Medium

Citrate Indole Motility, (Oxoid, CM0435B)

Bileşim	gram/litre
Tryptone	20.0
Peptone	6.1
Ferrous ammonium sulphate	0.2
Sodium thiosulphate	0.2
Agar	3.5
pH 7.3 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 30 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözdürüldü. Hazırlanan besiyerinin pH değeri kontrol edildi. Uygun pH aralığı (7.3 ± 0.2) ayarlanan besiyeri sıcak Su banyosunda tamamen eritildi. Daha sonra 16x150 mm tüplere 9 ml olacak şekilde dolduruldu. Tüpler 121°C’de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan tüpler oda sıcaklığına ulaştığında + 4°C’de muhafaza edildi.

2.1.2.5. Bile Esculin Agar

Bile Esculin Agar (Oxoid, CM0888B)

Bileşim	gram/litre
Peptone	14.0
Bile salts	15.0
Ferric citrate	0.5
Aesculin	1.0
Agar	15.0
pH 7.1 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 44.5 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan besiyerinin pH değeri kontrol edildi. Uygun pH aralığı (7.1 ± 0.2) ayarlanan besiyeri sıcak Su banyosunda tamamen eritildi. Daha sonra 121°C 'de 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğuduğunda sonra besiyerinden yaklaşık 12 ml steril petrilere dökülerek, oda sıcaklığında yaklaşık 12 saat bekletildi. Sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.1.2.6. Moeller Decarboxylase Broth Base

Moeller Decarboxylase Broth Base (BBL, 221659)

Bileşim	gram/litre
Peptic Digest of Animal Tissue	5.0
Beef Extract	5.0
Dextrose	0.5
Bromocresol Purple	0.01
Cresol Red	0.005
Pyridoxal	0.005
pH 6.2 ± 0.2	

- L-Arginin (Merck, 0059470)

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 10.5 gram ve % 1'lik L-Arginine besiyerinden 10 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan besiyerinin pH değeri kontrol edildi. Uygun pH aralığı (6.0 ± 0.2) ayarlanan besiyeri, 16x150 mm tüplere 9 ml olacak şekilde dolduruldu. Tüpler 121°C 'de 1 atm basınç altında 10 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan tüpler oda sıcaklığına ulaştığında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

2.1.2.7. Phenol Red Broth Base ve Şekerleri

- Phenol Red Broth Base (Merck, 110987)

Bileşim	gram/litre
Casein peptone	10.0
Sodium chloride	5.0

Phenol red	0.018
Demineralized water	1000 ml
pH 7.4 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Hazır besiyerinden 15 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan besiyerinin pH değeri kontrol edildi. Uygun pH aralığı (7.4 ± 0.2) ayarlanan besiyeri, 16x150 mm tüplere 9 ml olacak şekilde dolduruldu. Tüpler 121°C 'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkan tüpler oda sıcaklığına ulaştığında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

- D-mannitol (Merck, 105982), L-sorboz (Merck, 567692), D-riboz (Merck, 107605), Sükroz (Merck, 1076511000)

Hazırlanışı:

Karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları için % 10'luk şekilde karbonhidratlar hazırlandı. Bunun için hazır besiyerinden 1 gram tartılarak 100'luk balon joje'de distile su ile çözündürüldü. Daha sonra steril edilmiş 100'luk erlen içerisinde filtre kapağından geçirerek dolduruldu ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Daha sonra 1 ml hazırlanmış karbonhidrattan alınıp tüpler içerisinde 9 ml phenol red broth base'e eklendi ardından 24 saatlik saf bakteri kültüründen şüpheli koloniler bu besiyerine süspanse edildi ve karbonhidrat fermentasyon reaksiyonlarına bakıldı.

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

2.1.3.1. *Taq* DNA Polymerase Set

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

<i>Taq</i> DNA polymerase	500 U (5 U/ μl)
PCR Buffer	10 x
MgCl ₂	25 mM

2.1.3.2. dNTP Set

- dNTP Set (Promega, Madison, ABD)

dATP	100 mM
dCTP	100 mM
dGTP	100 mM
dTTP	100 mM

2.1.3.3. DNA Ladder ve Yükleme Solüsyonu

- Ladder DNA Marker 100 bp (Dr. Zeydanlı, Ankara, Türkiye)
- 6 x Bromophenol Blue Loading Dye (AppliChem-BioChemica, Darmstad, Germany)

2.1.3.4. Primerler

PCR analizlerinde (Ke ve ark., 1999; Dutka-Malen ve ark., 1995; Kariyama ve ark., 2000; Cheng ve ark., 1997; Jackson ve ark., 2004) tarafından belirlenen oligonükleotid primer çiftleri, Kariyama ve ark. (2000) tarafından belirlenen *van A* ve *van B* genlerinin spesifik primerleri kullanıldı. Liyofilize formda satın alınan primerler istenilen yoğunluk ayarlanacak şekilde firmanın bilgilendirme talimatlarına uygun şekilde ultra saf su ile sulandırıldı.

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

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

Tris	0.89 M
Boric acid	0.89 M
EDTA	0.02 M

Hazırlanışı:

10 X olarak bulunan stok solüsyondan 100 ml alınarak distile su yardımıyla 1 litreye tamamlandı. Sulandırılan solüsyon agaroz jel yapımı ve elektroforez aşamasında kullanılmak amacıyla 1 X yoğunlukta hazırlandı.

2.1.3.6. Ethidium Bromide (% 0.1'lik)

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

Hazırlanışı:

Stok solüsyon yardımıyla 1:9 oranında TBE ile sulandırılarak 1 µg / ml konsantrasyonda kullanıldı.

2.1.3.7. Agaroz Jel

- Agaroz Jel (Cambrex SeaKem LE Agarose, Rockland, USA)

PCR sonrasında amplikonların elektroforez işlemi için % 1.5'lik agaroz jel hazırlandı. Bu amaç ile 0.9 gram agaroz jel tartılarak 60 ml 1 X TBE içerisinde 90-95°C su banyosunda çözündürüldü. Agaroz jelin sıcaklığı 50°C'ye geldiğinde içerisine 60 µl ethidium bromide eklendi. Homojen bir şekilde dağılım sağlandıktan sonra elektroforez küveti (MINICELL EC 370M) içerisine döküldü. Oda sıcaklığında laminar flow içerisinde dondurularak elektroforez amacıyla kullanıldı.

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

2.1.4.1. Mueller-Hinton Agar

Mueller-Hinton Agar (Oxoid CM 0337B)

Bileşim	gram/litre
Beef, dehydrated infusion from	300.0

Casein hydrolysate	17.5
Starch	1.5
Agar	17.0
pH 7.3 ± 0.2	

Hazırlanışı:

Mueller-Hinton agardan 38 gram tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözdürüldü. Homojen hale gelmiş olan besiyerninin pH değeri kontrol edildi. Uygun pH değeri (7.3 ± 0.2) ayarlanan besiyeri sıcak Su banyosunda tamamen eritildi. Sonra 121°C 1 atm basınç altında 15 dakikada sterilize edildi. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 50-55°C sıcaklığa soğutulan besiyeri steril petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde yaklaşık 12-14 ml dökülerek hazırlandı.

2.1.4.2. Antibiyotik Diskleri

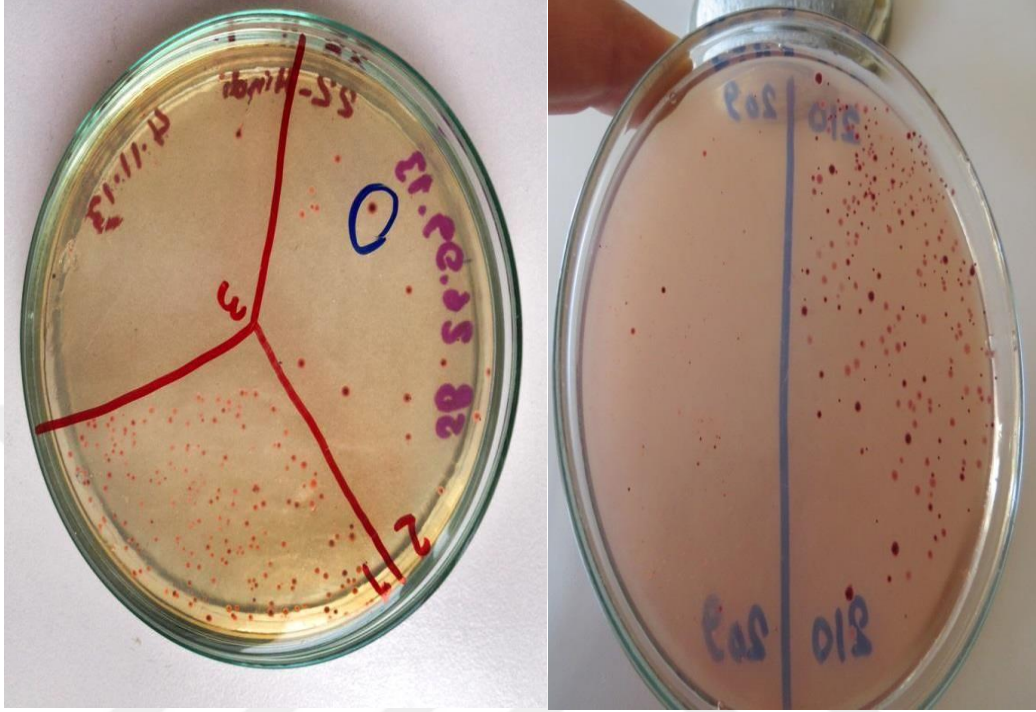
Eritromisin (Oxoid CT0020B)	15 µg
Kloramfenikol (Oxoid CT0013B)	30 µg
Gentamisin (Oxoid CT0794B)	120 µg
Penisilin (Oxoid CT0043B)	10 U
Streptomisin (Oxoid CT1897B)	300 µg
Vankomisin (Oxoid CT0058B)	30 µg
Linezolid (Oxoid CT1650B)	30 µg
Kinupristin-dalfopristin (Oxoid CT1644B)	15 µg

2.2. Yöntem

2.2.1. *Enterococcus* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu

Enterococcus spp. izolasyonu için hindi kuşbaşı örnekleri aseptik koşullarda steril poşetlere 10'ar g tartılmış, 90 ml tamponlanmış peptonlu su (TPS, Oxoid, CM0009) ile sulandırıldıktan sonra karışım 2 dk. boyunca stomacherde (AES Easy Mix) homojenize edilmiştir. Homojenattan 0.1 ml alınarak Slanetz–Bartley Agar'a (Oxoid, CM0377A) ekimi yapılarak 37°C'de aerob koşullarda 24-48 saat inkübe edilmiştir (Wegener ve ark., 1997). İnkübasyonu takiben oluşan en fazla 5 tipik kırmızı, kestane ya da pembe renkli koloni seçilerek (Şekil 2.1) % 0.6 maya ekstraktı (Oxoid, LP0021B) içeren Tryptone Soya Agar'a (Oxoid, CM0131) geçilmiştir. TSA'lar 37°C'de aerob koşullarda 24 saat inkübe edildi ve ardından

kolonilerin biyokimyasal reaksiyonlar yönünden değerlendirilmesi için +4°C’de saklanmıştır (Manero ve Blanch, 1999).

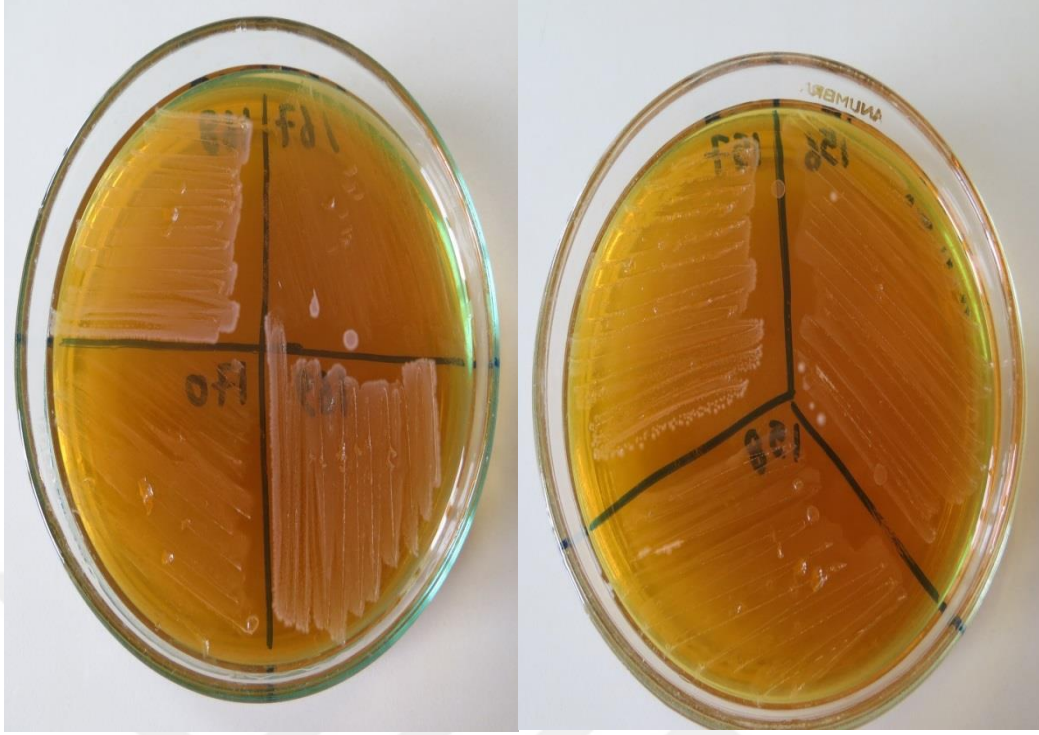


Şekil 2.1. Slanetz–Bartley Agar’da tipik kırmızı, kestane ya da pembe renkli şüpheli enterokok koloniler

2.2.2. Biyokimyasal Reaksiyonlar

2.2.2.1. Katalaz Reaksiyonu

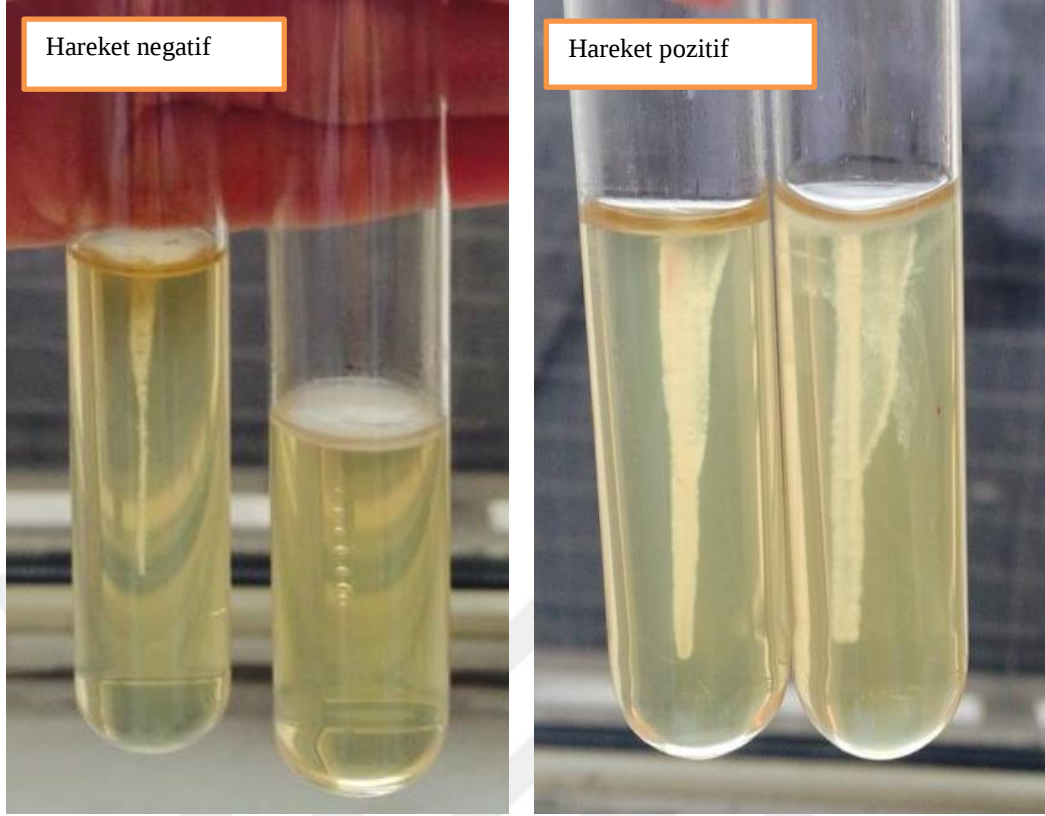
Koloniler 35°C’de Brain Heart Infusion Broth’da (Oxoid, CM1135B) üretilmiş 18-24 saatlik saf bakteri kültüründen öze ile lam üzerine konulmuştur. Lam üzerine 1 ml % 3’lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılarak, gaz kabarcıkları oluşturmeyen suşlar katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Hartman ve ark., 1992). Gram pozitif ve katalaz negatif izolatlar pH’sı 9.6 olan ve % 6.5’luk NaCl (Oxoid/Remel, LP 005 B) içeren MRS Agar’a (De Mann Rogosa Sharpe, Oxoid, CM0359B) ekim yapılarak 10°C ve 45°C’lerde anaerob koşullarda 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 2.2). İnkübasyon sonunda şüpheli kolonilerden diğer biyokimyasal testler yapılmıştır (Psoni ve ark., 2003).



Şekil 2.2. PH'sı 9.6 olan ve % 6.5'luk NaCl içeren MRS Agar'a üreyen şüpheli entrokok koloniler.

2.2.2.2. Motilite reaksiyonu

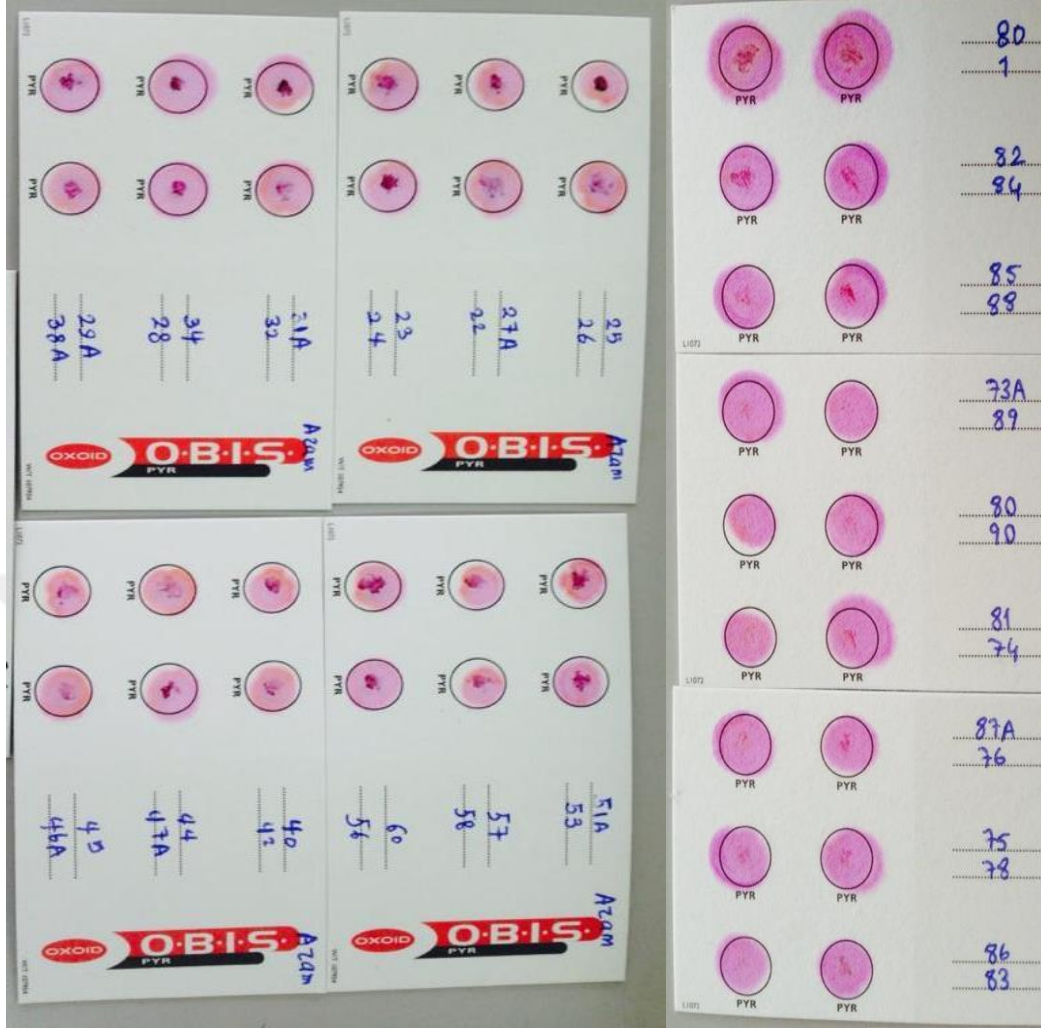
Hareket testi için bir öze dolusu koloni alınıp SIM Medium'a (Citrates Indole Motility, Oxoid, CM0435B) batırılarak ekim yapılmıştır. İnkübasyon 30°C'de 24 saat aerob koşullarda tamamlanmış ve değerlendirilmiştir. Üreme ekim hattının dışına taşmış ve besiyerinde bulanıklık oluşmuş koloniler hareket pozitif olarak değerlendirilmiştir. Üreme ekimin yapıldığı hat üzerinde kalmış koloniler ise hareket negatif olarak değerlendirilmiştir (Facklam ve Elliott, 1995), (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hareket negatif ve hareket pozitif koloniler SIM Medium agarda

2.2.2.3. L- pirolidonil- β -naftilamid Reaksiyonu

E. cecorum, *E. columbia*, *E. saccharoliticus* türleri dışındaki enterokoklar L-pirolidonil- β -naftilamid (PYR) hidrolizini gerçekleştirmektedir. PYR emdirilmiş filtre kağıdı (Oxoid, R30854401) üzerine 24 saatlik saf bakteri kültüründen 1-2 koloni konulduktan sonra 1 damla PYR ayıracı (% 0.015 p-dimetilaminosinamaldehit, Oxoid, R30854401) damlatılarak 2 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Kırmızımtırak renk veren suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hartman ve ark., 1992), (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. L- pirolidonil- β-naftilamid Reaksiyonunda (PYR), kırmızımtırak renk veren pozitif suşlar.

2.2.2.4. Eskülin Fermentasyonu

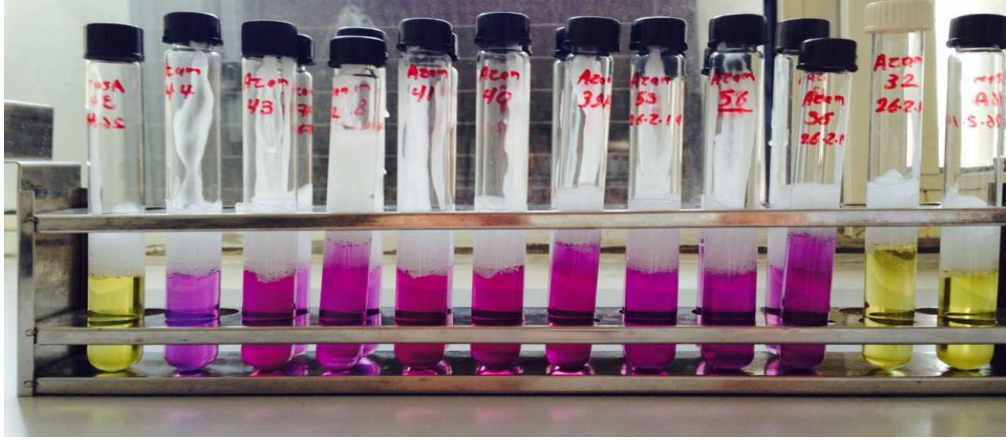
Eskülin hidrolizi için Bile Esculin Agar’a (Oxoid, CM0888B) 24 saatlik saf bakteri kültüründen ekim yapılmıştır. 35°C’ de en fazla 7 gün inkübe edilmiştir (Facklam ve Elliott, 1995). İnkübasyon sonunda eskülin hidrolize olarak eskuletin ortaya çıkmaktadır. Eskuletin ise Fe^{+3} ile reaksiyona girerek ortam koyu kahve-siyah renge dönüşmektedir. Siyah renk oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hartman ve ark., 1992), (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bile Esculin Agarda siyah renk oluşturan pozitif suşlar

2.2.2.5. Arjinin Dekarboksilasyon Reaksiyonu

Arjinin dekarboksilasyon testi için Moeller Decarboxylase Broth Base (BBL, 221659) kullanılmıştır. Şüpheli kolonilerden ekim yapılmış ve yüzeyi steril mineral yağ ile kaplanmıştır. 35°C’de en fazla 7 güne kadar inkübe edilmiştir. Pozitif suşlar besi yerini mavi mor renge dönüştürürken negatif suşlar besi yerini sarı renge dönüştürmektedir (Facklam ve Elliott, 1995), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ekim yapılmış Moeller Decarboxylase Broth Base’lerin, 35°C’de en fazla 7 güne kadar inkübe edilmesi, pozitif suşlar besiyerini mavi mor renge ve negatif suşlar besiyerini sarı renge dönüştürülmesi.

2.2.2.6. Pigmentasyon Reaksiyonu

Tryptone Soya Agar’a (TSA, Oxoid, CM0131) bakteri kültüründen ekim yapılmış ve besiyerleri 37°C’de 24 saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda steril pamuklu svapla alınan kolonilerin pigmentasyonuna bakılmıştır. Svap yüzeyinde gözlenen sarı renk oluşumu pozitif olarak kabul edilmiştir (Facklam ve Collins, 1989).

2.2.2.7. Karbonhidrat Fermentasyon Reaksiyonları

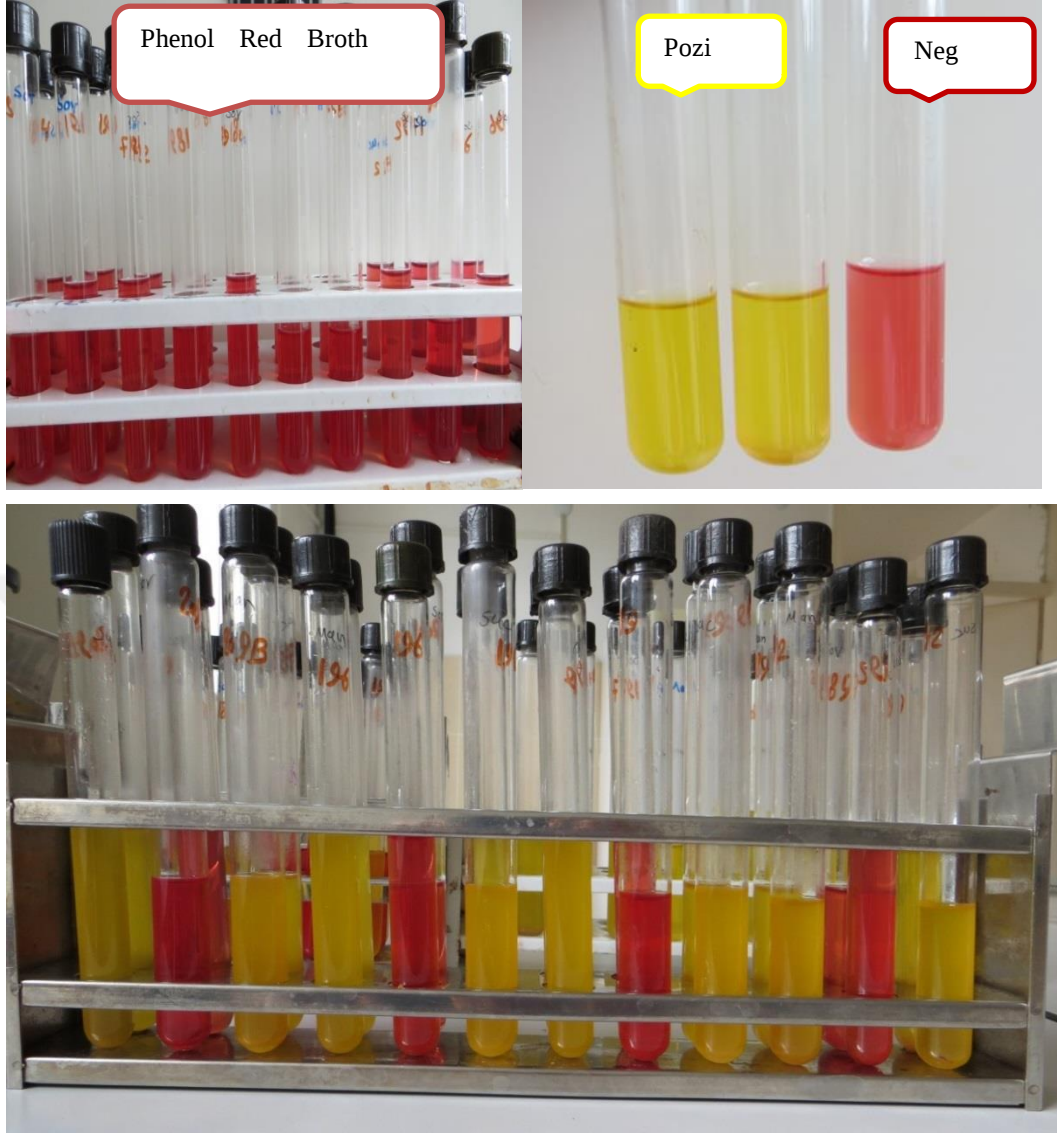
D-mannitol (Merck, 105982), L-sorboz (Merck, 567692), D-riboz (Merck, 107605), sükroz (Merck, 1076511000) yönünden karbonhidrat fermentasyon testleri yapılmıştır. Phenol Red Broth Base’e (Merck, 110987) % 1’lik olacak şekilde karbonhidratlar (mannitol, sorboz, riboz, sükroz) eklenmiştir. 24 saatlik saf bakteri kültüründen şüpheli koloni karbonhidratlı besiyerine süspanse edilip aerobik koşullar altında 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinin sarı renge dönüşümü pozitif, rengin aynı kalması ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Manero ve Blanch, 1999), (Şekil 2.7). *Enterococcus* spp. özellikleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Klasik kültür yöntemi ile *Enterococcus* spp. identifikasyonundan sonra izolatlar, PCR (Polymerase Chain Reaction: Polimeraz Zincir Reaksiyonu) doğrulanmasına kadar 0.6 ml gliserol ve 0.9 ml Brain Heart Infusion Broth’da, cryoviallerde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.1. *Enterococcus* spp. özellikleri (Manero ve Blanch, 1999).

Mikroorgani zma	<i>E.</i> <i>casseliflavu</i> <i>s</i>	<i>E.</i> <i>duran</i> <i>s</i>	<i>E.</i> <i>faecali</i> <i>s</i>	<i>E.</i> <i>faeciu</i> <i>m</i>	<i>E.</i> <i>gallinaru</i> <i>m</i>	<i>E.</i> <i>hira</i> <i>e</i>
Mannitol	+	-	+	+	+	-
Sukroz	+	F	+	+	+	+
Riboz	+	+	+	+	+	+
Sorboz	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	F	-	-	F	+	F
Katalaz	-	-	-	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	F	+	+	+	+	+
Eskülin	+	+	+	+	+	+
PYR	+	+	+	+	+	+
Motilite	+	-	-	-	+	-
Sarı pigment	+	-	-	-	-	-
4°C' de gelişme	VY	VY	-	+	-	VY
10°C' de gelişme	+	+	+	+	+	+

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



Şekil 2.7. Phenol Red Broth Base'e % 1'lik olacak şekilde karbonhidratlar (mannitol, sorboz, riboz, sükröz) eklendi, şüpheli koloni karbonhidratlı besiyerine süspanse edili, aerobik koşullar altında 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı, besiyerinin sarı renge dönüşümü pozitif, rengin aynı kalması ise negatif olarak değerlendirildi.

2.2.3. PCR Analizi ile Enterokokların Doğrulanması

Enterokok türlerinin doğrulanması, *tuf* geni saptanarak yapılmıştır. Bunun için Ent 1 ve Ent 2 primerleri kullanılmıştır (Ke ve ark., 1999).

Bu amaçla Chelex 100 resin tekniği kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ayrıca -20°C'de cryoviallerde saklanan izolatlar Brain Heart Infusion

Broth'a (BHI, Oxoid CM0225) geçilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası BHI brothdan 1 ml mikrosantrifüj tüplerine alınarak 12,000 g'de 6 dakika santrifüj edilmiştir (Eppendorf Centrifuge 5417R). Pelet % 6 Chelex 100 resinden 200 µl konularak resüspanse edilip, üzerine 2 µl proteinaz K eklenmiştir. Süspansiyonlar karıştırılıp 55°C'de 40 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra 100°C'de 8 dk boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Tekrar 12,000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek PCR aşamalarına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

PCR amplifikasyonu, toplam 50 µl hacimde gerçekleştirilmiş olup bileşiminde 1x PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (Ph 8.3), 50 mmol l⁻¹ KCl, % 0.01 Tween–20], 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, her bir dNTP'den 200 µmol l⁻¹, her bir primerden 10 pmol, 2.5 U Taq DNA polymerase ve 10 µl örnek DNA içeren PCR karışımı kullanılmıştır. Amplifikasyon işlemi, thermal cycler'da (Biometra Personel Cycler) 94°C'de 10 dk ilk denatürasyon işleminin ardından, 30 siklus 94°C'de 15 sn denatürasyon, 55°C'de 15 sn bağlanma ve 72°C'de 45 sn DNA uzatma ve son olarak 72°C'de 5 dk uzatma işlemleri ile yapılmıştır (Kasimoğlu Doğru ve ark., 2010). PCR işlemini takiben elde edilen ampikonlar bromophenolphicol blue ile boyanmış, ethidium bromide (0.1 µg/ml) ile boyanan % 1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve bandlar UV transluminator (Biometra TI1 UV 9511011) üzerinde jel dokümantasyon sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Oluşan spesifik bandlar DNA marker ve pozitif kontrol yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilmiştir ve jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyon yapılmıştır (Syn-gene, Cambridge, UK).

E. faecalis ATCC 29212, *E. faecalis* WHO3 (van A⁺), *E. faecalis* WHO14 (van B⁺), *E. faecium* tetM 7003, *E. gallinarum* C30BR, *E. durans* (wild type), *E. hirae* (wild type) suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ([Kasimoglu-Dogru](#) ve ark., 2010).

2.2.4. Multipleks PCR ile *Enterococcus* spp. İdentifikasyonu

E. faecium, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* türlerinin doğrulanması için 2 farklı Multipleks PCR protokolü uygulanmıştır. *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* türlerinin doğrulanması için Kariyama ve ark.'nın (2000), *E. durans*, *E. hirae* türlerinin doğrulanması için Jackson ve ark.'nın (2004) multipleks PCR

protokolleri kullanılmıştır. Multipleks PCR’da kullanılan primer çiftleri Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Template DNA olarak yukarıda belirtilen ekstraktlar kullanılmıştır. *E. durans*, *E. hirae* türlerinin doğrulanması için hazırlanan karışım toplam 50 µl hacimde olup bileşiminde 1x PCR buffer [16 mmol l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 67 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.8), % 0.01 Tween–20], 2.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, her bir dNTP’den 0.2 mmol l⁻¹, her bir primerden 50 pmol, 2 U Taq DNA polymerase ve 10 µl örnek DNA içeren PCR karışımı kullanılmıştır. *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* türlerinin doğrulanması için hazırlanan karışım toplam 50 µl hacimde olup bileşiminde 1x PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol l⁻¹ KCl, % 0.01 Tween–20], 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, her bir dNTP’den 0.2 mmol l⁻¹, her bir primerden 50 pmol, 0.625 U Taq DNA polymerase ve 10 µl örnek DNA içeren PCR karışımı kullanılmıştır. Her iki PCR master miks amplifikasyonu için thermal cycler’da (Biometra Personal Cycler) başlangıç denatürasyonu 94°C’de 5 dk (*E. durans* ve *E. hirae* için 95°C’de 4 dk), ilk denatürasyon işleminin ardından, 30 siklus 94°C’de 1 dk denatürasyon (*E. durans* ve *E. hirae* için 95°C’de 30 sn), 54°C’de 1 dk bağlanma (*E. durans* ve *E. hirae* için 55°C–60°C’de 1 dk), 72°C’de 1 dk DNA uzatma ve son olarak 72°C’de 1 dk uzatma (*E. durans* ve *E. hirae* için 72°C’de 7 dk) yapılmıştır (Kariyama ve ark., 2000; Jackson ve ark., 2004). PCR işlemini takiben elde edilen amplikonlar bromophenolphicol blue ile boyanarak, ethidium bromide (0.1 µg/ml) ile boyanan % 1.5 agaroz jelde yürütülerek ve bandlar UV transluminator (Biometra TI1 UV 9511011) üzerinde jel dokümantasyon sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Oluşan spesifik bandlar DNA marker ve pozitif kontrol yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilmiştir ve jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyon yapılmıştır (Syn- gene, Cambridge, UK).

E. faecalis ATCC 29212 (tuf gen pozitif), *E. faecalis* WHO3 (van A⁺), *E. faecalis* WHO14 (van B⁺), *E. faecium* tetM 7003, *E. gallinarum* C30BR, *E. durans* (wild type), *E. hirae* (wild type) suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ([Kasimoglu-Dogru](#) ve ark., 2010).

Çizelge 2.2. PCR analizlerinde kullanılan oligonükleotid primer çiftleri (Ke ve ark., 1999; Dutka-Malen ve ark., 1995; Kariyama ve ark., 2000; Cheng ve ark., 1997; Jackson ve ark., 2004).

Hedef gen	Oligonükleotid primer çiftleri	Sekans (5' - 3')	PCR ürünü (bp)	Kaynaklar
<i>Tuf</i>	Ent1 Ent2	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	Ke ve ark. (1999)
<i>van C_{1E}. gallinarum</i>	C1 C2	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	Dutka-Malen ve ark. (1995)
<i>ddl_{E. faecalis}</i>	ddlE1 ddlE2	ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAG T	941	Kariyama ve ark. (2000)
<i>ddl_{E. faecium}</i>	ddlF1 ddlF2	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Cheng ve ark. (1997)
<i>ddl_{E. durans}</i>	DU1 DU2	CCTACTGATATTAAGACAGCG TAATCCTAAGATAGGTGTTG	295	Jackson ve ark. (2004)
<i>ddl_{E. hirae}</i>	HI1 HI2	CTTCTGATATGGATGCTGTC TAAATCTTCCTTAAATGTTG	187	Jackson ve ark. (2004)

2.2.5. Antibiyotik Direnç Profillerinin Saptanması için Disk Difüzyon Yöntemi

İzolatların antimikrobiyel direnç profilleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu işlem CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından bildirilen yöntem esas alınarak Mueller Hinton Agar'da (Oxoid, CM0337B) ve eritromisin (15 µg, Oxoid CT0020B), kloramfenikol (30 µg, Oxoid CT0013B), gentamisin (120 µg, Oxoid CT0794B), penisilin (10 U, Oxoid CT0043B), streptomisin (300 µg, Oxoid CT1897B), vankomisin (30 µg, Oxoid CT0058B), linezolid (30 µg, Oxoid CT1650B), kinupristin-dalfopristin (15 µg, Oxoid CT1644B) olmak üzere toplam 8 antibiyotik diski kullanılarak yapılmıştır (Anon, 2011 b). Bu amaçla; PCR metodu ile identifiye edilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* izolatları Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM0225) içerisine transfer edilerek 37°C'de, türbiditesi 0.5 McFarland standardına gelinceye kadar inkübe edilmiştir. Türbidite standardı NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop ND-100, Delaware, USA) kullanılarak doğrulanmıştır. Broth içerisindeki kültürün 625 nm dalga boyunda 0.08-0.13 aralığında sabitlendiği değer CLSI standardına göre optimum olarak değerlendirilmiştir. Türbidite ayarlandıktan sonra steril svab, kültür içerisine daldırılıp tüpün çeperinde süzdürülerek Mueller Hinton Agar (4 mm kalınlığında) yüzeyine yayılmıştır. Agar yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik

diskleri (120 mm çapındaki plak içerisinde en fazla 8 disk olacak şekilde) yerleştirilerek 35°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülerek CLSI standartlarında belirtildiği gibi dirençli, orta düzeyde dirençli ve duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Anon, 2011b).

2.2.6. *E. faecalis* ve *E. faecium* İzolatlarında Multipleks PCR ile *van A* ve *van B* Genlerinin Belirlenmesi

Seçilen *van A* ve *van B* genlerinin spesifik primerleri ve PCR protokolü Kariyama ve ark.’nın (2000) yaptıkları çalışmaya göre uygulanmıştır. Bu amaçla multipleks PCR’da kullanılan primer çiftleri izelge 2.3’te gösterilmektedir. Daha nce PCR amplifikasyonunu için hazırlanan izolatlardan 5 l template DNA kullanılmıştır. Multipleks PCR toplam 25 l hacimde gerçekleştirilmiş olup bileşiminde 1x PCR buffer [10 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol l⁻¹ KCl, % 0.01 Tween–20], 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, her bir dNTP’den 0.2 mmol l⁻¹, her bir primerden 5 pmol, 0.625 U Taq DNA polymerase karışımı kullanılmıştır. Amplifikasyon işlemi, thermal cycler’da (Biometra Personal Cycler) 94°C’de 5 dk ilk denatürasyon işleminin ardından, 30 siklus 94°C’de 1 dk denatürasyon, 54°C’de 1 dk bağlanma ve 72°C’de 1 dk DNA uzatma ve son olarak 72°C’de 10 dk uzatma yapılmıştır. PCR işlemini takiben elde edilen amplikonlar ethidium bromide (0.1 g/ml) ile boyanan % 1.5 agaroz jelde yürütülmüş ve bandlar UV transluminator (Biometra TII UV 9511011) zerinde jel dokümentasyon sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Oluşan spesifik bandlar DNA marker ve pozitif kontrol yardımıyla UV ışığı altında değerlendirilmiş ve jel görüntüleme sistemi ile dökümantasyon yapılmıştır.

E. faecalis ATCC 29212, *E. faecalis* WHO3 (*van A*⁺), *E. faecalis* WHO14 (*van B*⁺), *E. faecium* tetM 7003, *E. gallinarum* C30BR, *E. durans* (wild type), *E. hirae* (wild type) suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ([Kasimoglu-Dogru](#) ve ark., 2010).

Çizelge 2.3. Multipleks PCR’da kullanılan *van A* ve *van B* oligonükleotid primer çiftleri (Evers ve ark., 1993; Handwerger ve ark., 1992; Kariyama ve ark., 2000).

He de f ge n	Oligonükleotid primer çiftleri	Sekans (5’ - 3’)	PCR ürünü (bp)	Kaynaklar

<i>Va</i> <i>n</i> A	A1 A2	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAA TA CCCCCTTAACGCTAATACGATCA A	1030	Evers ve ark. (1993); Kariyama ve ark. (2000)
<i>Va</i> <i>n</i> B	B1 B2	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	433	Handwerger ve ark. (1992); Kariyama ve ark. (2000)

2.2.7. Vankomisinin İzolatlara Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi için E-Test Yöntemi

Türbiditesi 0.5 McFarland standardına getirilen izolatlardan Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM0337B) yüzeyine svab tekniği ile yayılmıştır. Takiben agar yüzeyine, vankomisin içeren E-test şeritleri (Oxoid, MA0102F) yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C'de 24-48 saat inkübe edilip MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri belirlenmiştir. MİK değeri şerit etrafında oluşan inhibisyon elipsinin şerit üzerindeki ölçekle kesiştiği nokta olarak kabul edilmiştir (Huang ve ark., 1992). Bu nokta CLSI standardına göre vankomisin dirençli enterokoklar için ≥ 32 µg/ml, vankomisin duyarlı enterokoklar için ≤ 4 µg/ml olarak kabul edilmiştir (Anon, 2014).

3. Bulgular

Hindi kuşbaşı örneklerinde *Enterococcus* spp. varlığının saptanması, doğrulanması ve tiplendirmesi, antibiyotik direnç profillerinin araştırılması, *E. faecalis*, *E. faecium*'da *van A* ve *van B* vankomisin direnç genlerinin belirlenmesi ile vankomisin direnci saptanan izolatların minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanan bu çalışmada, Ankara'da farklı marketlerden temin edilen taze olarak satışa sunulan 100 hindi kuşbaşı örneği, Eylül, Ekim, Kasım, Aralık ve Ocak aylarında toplanmış ve analiz edilmiştir.

3.1. *Enterococcus* spp. İzolasyon ve İdentifikasyonu

Çalışmada biyokimyasal reaksiyonlarına göre analiz edilen 100 hindi kuşbaşı örneğinin 50'sinin (% 50) *Enterococcus* spp. ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. Hindi kuşbaşı örnekleri toplam 2 marka ve 8 açıkta dökme satış noktalarından alınmıştır ve bunların hepsine 1-10'a kadar firma ismi verilmiştir. Toplam 100 hindi kuşbaşı örneğinin 21'i birinci firmaya, 15'i ikinci firmaya, 12'si üçüncü firmaya, 10'ü dördüncü firmaya, 3'ü beşinci firmaya, 12'si altıncı firmaya, 10'u yedinci firmaya, 5'i sekizinci firmaya, 9'u dokuzuncu firmaya ve 3'ü onuncu firmaya ait oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

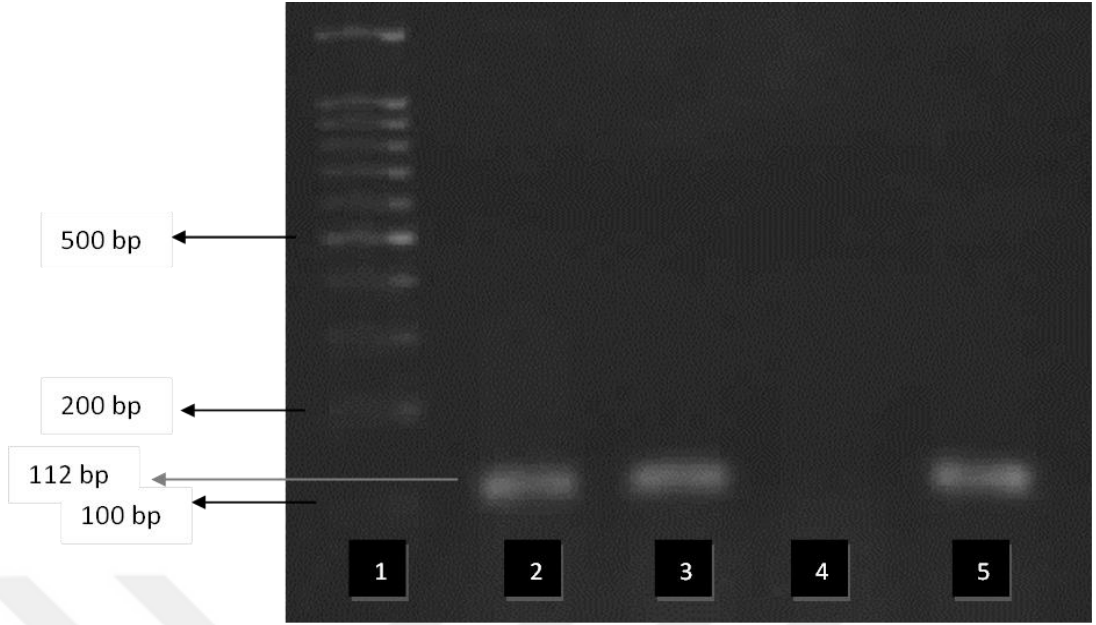
Pozitif örneklerle ait plaklardan seçilen alt izolatlar aynı *Enterococcus* spp. türüne ait saptandığı için her bir pozitif örnek için bir izolat seçilerek analizleri yapılmıştır. Eylül ayına ait toplam 7 *Enterococcus* spp. izolatının 3'ü *E. faecalis* ve 4'ü *E. faecium*, Ekim ayına ait toplam 2 *Enterococcus* spp. izolatının 2'si de *E. faecalis*, Kasım ayına ait toplam 11 *Enterococcus* spp. izolatının 5'i *E. faecalis*, 4'ü *E. faecium*, 1'i *E. hirae* ve 1'i *E. casseliflavus*, Aralık ayına ait toplam 12 *Enterococcus* spp. izolatının 6'sı *E. faecalis*, 2'si *E. faecium*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. casseliflavus* ve 2'si *E. gallinarum*, Ocak ayına ait toplam 18 *Enterococcus* spp. izolatının 5'i *E. faecalis*, 9'ü *E. faecium*, 1'i *E. casseliflavus* ve 3'ü *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1. Firmalara göre hindi kuşbaşı örneklerinde *Enterococcus* spp. izolasyonu.

Firma	Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı (%)	Entrokok türleri	<i>Enterococcus</i> spp.'lerin sayısı
1	21	16 (% 76.19)	<i>E. faecalis</i>	6
			<i>E. faecium</i>	8
			<i>E. gallinarum</i>	2
2	15	8 (% 53.33)	<i>E. faecalis</i>	4
			<i>E. faecium</i>	3
			<i>E. casseliflavus</i>	1
3	12	6 (% 50)	<i>E. faecalis</i>	3
			<i>E. faecium</i>	1
			<i>E. gallinarum</i>	2
4	10	3 (% 30)	<i>E. faecalis</i>	2
			<i>E. casseliflavus</i>	1
5	3	2 (% 66.66)	<i>E. faecalis</i>	2
6	12	4 (% 33.33)	<i>E. faecalis</i>	1
			<i>E. faecium</i>	3
7	10	4 (% 40)	<i>E. faecalis</i>	1
			<i>E. faecium</i>	2
			<i>E. casseliflavus</i>	1
8	5	3 (% 60)	<i>E. faecium</i>	2
			<i>E. hirae</i>	1
9	9	3 (% 33.33)	<i>E. faecalis</i>	1
			<i>E. gallinarum</i>	1
			<i>E. durans</i>	1
10	3	1 (% 33.33)	<i>E. faecalis</i>	1

3.2. PCR Analizi ile Enterokokların Doğrulanması

Klasik kültür tekniği ile izole edilen *Enterococcus* spp.'lerin doğrulanması amacıyla *tuf* gen sekansı esas alınarak yapılan PCR analizinde bütün izolatların *tuf* genine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1). Çalışmada her hindi kuşbaşı örneğinden elde edilen izolatların aynı *Enterococcus* spp. türlerine ait olduğu belirlenmiştir.



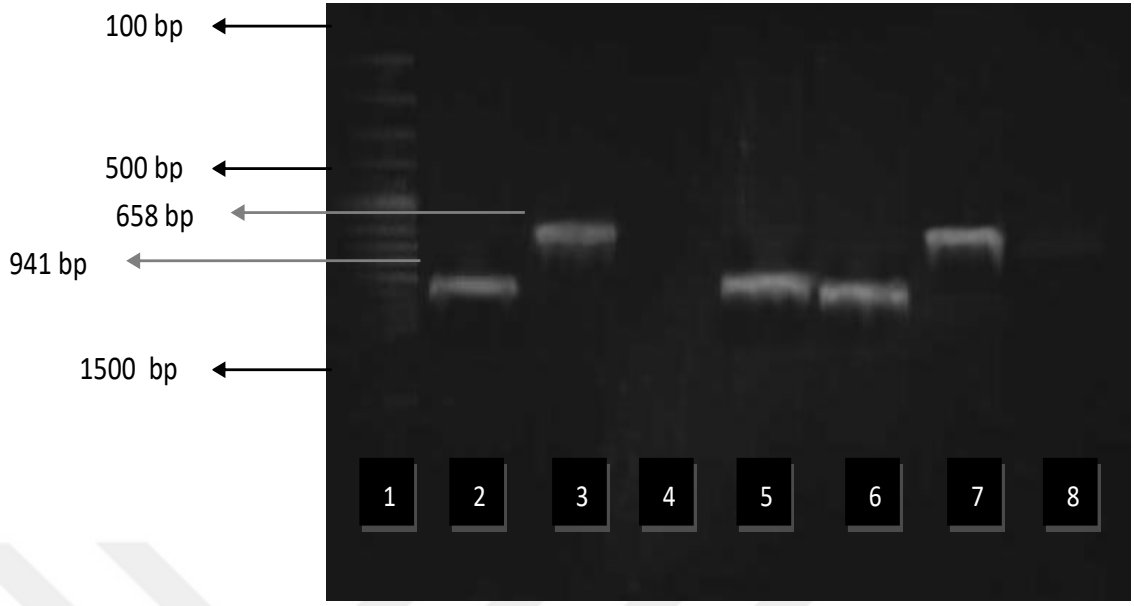
Şekil 3.1. PCR ile *tuf* geni tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: 100 bp DNA marker 2-3: *tuf* geni pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 4: Negatif control 5: Pozitif kontrol; *E. faecalis* ATCC 29212, *tuf* gen pozitif).

Tuf geni pozitif 50 *Enterococcus* spp. izolatının 16'sının birinci firmaya, 8'inin ikinci firmaya, 6'sının üçüncü firmaya, 3'ünün dördüncü firmaya, 2'sinin beşinci firmaya, 4'ünün altıncı firmaya, 4'ünün yedinci firmaya, 3'ünün sekizinci firmaya, 3'ünün dokuzuncu firmaya ve 1'inin onuncu firmaya ait olduğu belirlenmiştir.

3.3. Multipleks PCR ile *Enterococcus* spp. İdentifikasyonu

E. faecium, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* türlerinin doğrulanması için 2 farklı multipleks PCR protokolü uygulanmıştır.

Enterococcus spp. olarak belirlenen 50 örneğin 21'i (% 42) *E. faecalis*, 19'u (% 38) *E. faecium*, 5'i (% 10) *E. gallinarum*, 1'i (% 2) *E. durans* olarak identifiye edilmiştir (Şekil 3.2). Multipleks PCR ile elde edilen serotiplendirme sonuçları, biyokimyasal test sonuçları ile örtüşmüştür.



Şekil 3.2. Multipleks PCR ile *ddl_{E. faecalis}* ve *ddl_{E. faecium}* genleri tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol *E. faecalis* ATCC 29212 (*ddl_{E. faecalis}* gen pozitif) 3: Pozitif kontrol *E. faecium* tetM 7003 (*ddl_{E. faecium}* gen pozitif) 4: Negatif kontrol 5-6: *ddl_{E. faecalis}* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 7-8: *ddl_{E. faecium}* *E. faecium* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları).

Hindi örneklerinde *E. faecalis* olarak belirlenen örneklerin 6'sı birinci firmaya, 4'ü ikinci firmaya, 3'ü üçüncü firmaya, 2'si dördüncü firmaya, 2'si beşinci firmaya, diğerleri ise 6,7,9 ve 10'uncü firmalara ait olduğu belirlenmiştir.

E. faecium olarak belirlenenlerin ise; 8'i birinci firmaya, 3'ü ikinci firmaya, 3'ü altıncı firmaya, 2'si yedinci firmaya, 2'si sekizinci firmaya, 1'i üçüncü firmaya ait olduğu belirlenmiştir.

E. gallinarum olarak belirlenen örneklerin 2'si birinci firmaya, 2'si üçüncü firmaya ve 1'i doküzüncü firmaya, *E. durans* olarak belirlenen bir örnek ise doküzüncü firmaya ait olduğu belirlenmiştir.

Biyokimyasal testler kullanılarak yapılan analizlerde, izolatlardan 1'i (% 2) *E. hirae*, 3'ü (% 6) ise *E. casseliflavus* olarak izole edilmiştir. *E. hirae* olarak belirlenen

izolat sekizinci firmaya, *E. casseliflavus* olarak belirlenen izolatların 1'i ikinci firmaya, 1'i dördüncü firmaya ve 1'i yedinci firmaya ait olduğu belirlenmiştir.

3.4. Disk Difüzyon Yöntemi ile Enterokokların Antibiyotik Direnç Profillerinin

İzolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla yapılan analiz sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. izolatlarının panelde bulunan 8 antibiyotiğe yüksek oranda dirençli ve/veya orta düzeyde dirençli oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)	Enterococcus pozitif izolatlar (%)		
	R*	I*	S*
Eritromisin (E-15)	36 (72)	13 (26)	1 (2)
Kloramfenikol (C-30)	9 (18)	31 (62)	10 (20)
Gentamisin (CN-120)	1 (2)	5 (10)	44 (88)
Penisilin (P-10)	14 (28)	-	36 (72)
Streptomisin (S-300)	6 (12)	8 (16)	36 (72)
Vankomisin (VA-30)	43 (86)	7 (14)	-
Linezolid (LZD-30)	29 (58)	16 (32)	5 (10)
Kinupristin/dalfopristin (QD-15)	46 (92)	2 (4)	2 (4)

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

Eritromisine (E-15) dirençli 36 izolatının; 13'ü *E. faecalis*, 17'si *E. faecium*, 3'ü *E. gallinarum*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* ve 1'i *E. casseliflavus*, eritromisine (E-15) orta düzeyde dirençli 13 izolatının; 8'i *E. faecalis*, 1'i *E. faecium*, 2'si *E. gallinarum*, ve 2'si *E. casseliflavus*, eritromisine (E-15) duyarlı bir izolat ise *E. faecium* olarak identifiye edilmiştir.

Kloramfenikole (C-30) dirençli 9 izolatının; 5'i *E. faecalis*, 3'ü *E. faecium* ve 1'i *E. gallinarum*, kloramfenikole (C-30) orta düzeyde dirençli 31 izolatının; 11'i *E. faecalis*, 12'si *E. faecium*, 4'ü *E. gallinarum*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* ve 2'si *E. casseliflavus*, kloramfenikole (C-30) duyarlı 10 izolatının; 6'si *E. faecalis*, 3'ü *E. faecium* ve 1'i *E. casseliflavus* olarak belirlenmiştir.

Gentamisine (CN-120) dirençli bir izolat *E. faecalis*, gentamisine (CN-120) orta düzeyde dirençli 5 izolatının; 2'si *E. faecalis*, 2'si *E. faecium* ve 1'i *E. gallinarum*, gentamisine (CN-120) duyarlı 44 izolatının; ; 18'i *E. faecalis*, 17'si *E. faecium*, 4'ü *E. gallinarum*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* ve 3'ü *E. casseliflavus* olarak saptanmıştır.

Penisiline (P-10) dirençli 14 izolatının; 6'sı *E. faecalis*, 6's *E. faecium*, 1'i *E. gallinarum* ve 1'i *E. durans*, penisiline (P-10) duyarlı 36 izolatının; 15'i *E. faecalis*, 13'ü *E. faecium*, 4'ü *E. gallinarum*, 1'i *E. hirae* ve 3'ü *E. casseliflavus* olarak saptanırken penisiline (P-10) orta düzeyde dirençli izolat saptanmamıştır.

Streptomisine (S-300) dirençli 6 izolatının; 3'ü *E. faecalis*, 2'si *E. faecium* ve 1'i *E. casseliflavus*, streptomisine (S-300) orta düzeyde dirençli 8 izolatının; 3'ü *E. faecalis*, 3'ü *E. faecium*, 2'si *E. gallinarum*, streptomisine (S-300) duyarlı 36 izolatının; 15'i *E. faecalis*, 14'ü *E. faecium*, 3'ü *E. gallinarum*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* ve 2'si *E. casseliflavus* olarak belirlenmiştir.

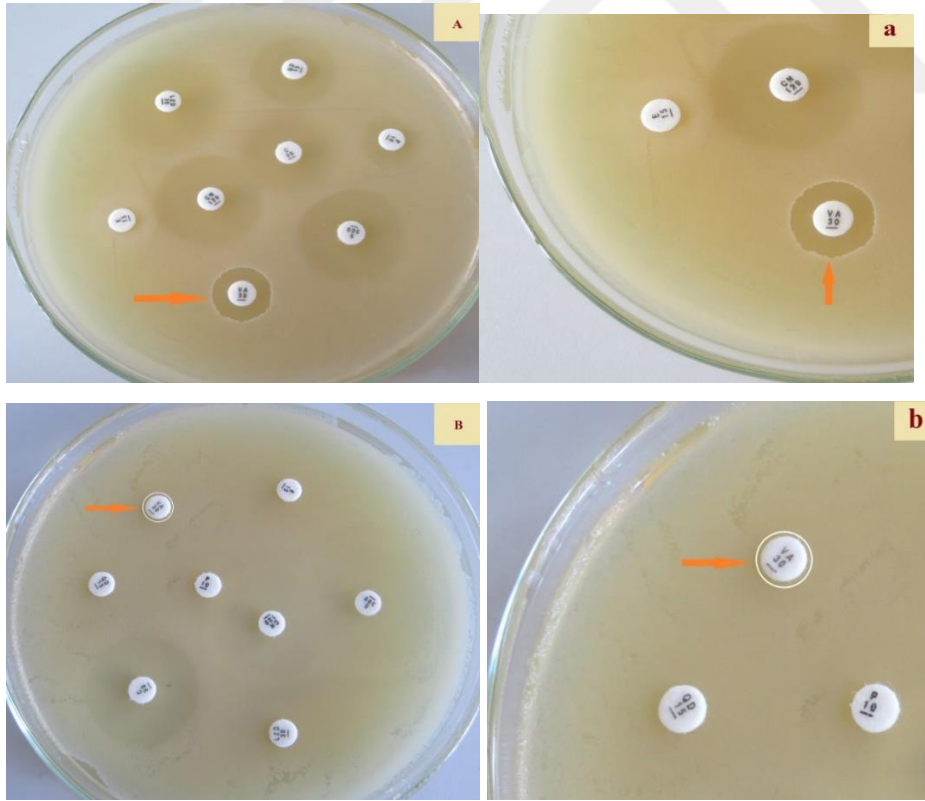
Linezolid (LZD-30) dirençli 29 izolatının; 12'si *E. faecalis*, 13'ü *E. faecium*, 1'i *E. gallinarum*, 1'i *E. hirae* ve 2'si *E. casseliflavus*, linezolid (LZD-30) orta düzeyde dirençli 16 izolatının; 7'si *E. faecalis*, 4'ü *E. faecium*, 4'ü *E. gallinarum* ve 1'i *E. casseliflavus*, linezolid (LZD-30) duyarlı 5 izolatının; 2'si *E. faecalis*, 2'si *E. faecium* ve 1'i *E. durans* olarak idetifiye edilmiştir.

Kinupristin/dalfopristine (QD-15) dirençli 46 izolatının; 18'i *E. faecalis*, 18'i *E. faecium*, 5'i *E. gallinarum*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* ve 3'ü *E. casseliflavus*, kinupristin/dalfopristine (QD-15) orta düzeyde 2 izolatının; 1'i *E. faecalis*, 1'i *E. faecium*, kinupristin/dalfopristine (QD-15) duyarlı 2 izolatının; 2'si de *E. faecalis* olarak belirlenmiştir.

Vankomisine (VA-30) dirençli 43 izolatının; 18'i *E. faecalis*, 15'i *E. faecium*, 5'i *E. gallinarum*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* ve 3'ü *E. casseliflavus*, vankomisine (VA-30) orta düzeyde dirençli 7 izolatının; 3'ü *E. faecalis* ve 4'ü *E. faecium* olarak belirlenirken vankomisine (VA-30) duyarlı izolat belirlenmemiştir (Şekil 3.3).

Vankomisine (VA-30) dirençli 18 *E. faecalis* izolatının; 4'ünde *van A* geni, 9'unda *van B* geni, vankomisine (VA-30) dirençli 15 *E. faecium* izolatının; 2'sinde *van A* geni, 4'ünde *van B* geni, vankomisine (VA-30) dirençli 5 *E. gallinarum* izolatının; 1'inde *van A* geni, 1'inde *van B* geni, vankomisine (VA-30) dirençli bir *E. durans* izolatında *van B* geni, vankomisine (VA-30) dirençli bir *E. hirae* izolatında *van B* geni, vankomisine (VA-30) dirençli 3 *E. casseliflavus* izolatının 1'inde *van B* geni saptanmıştır.

Vankomisine (VA-30) orta düzeyde dirençli 4 *E. faecium* izolatının; 1'inde *van B* geni belirlenirken vankomisine (VA-30) orta düzeyde dirençli 3 *E. faecalis* izolatının hiçbirinde *van A* veya *van B* geni belirlenmemiştir.



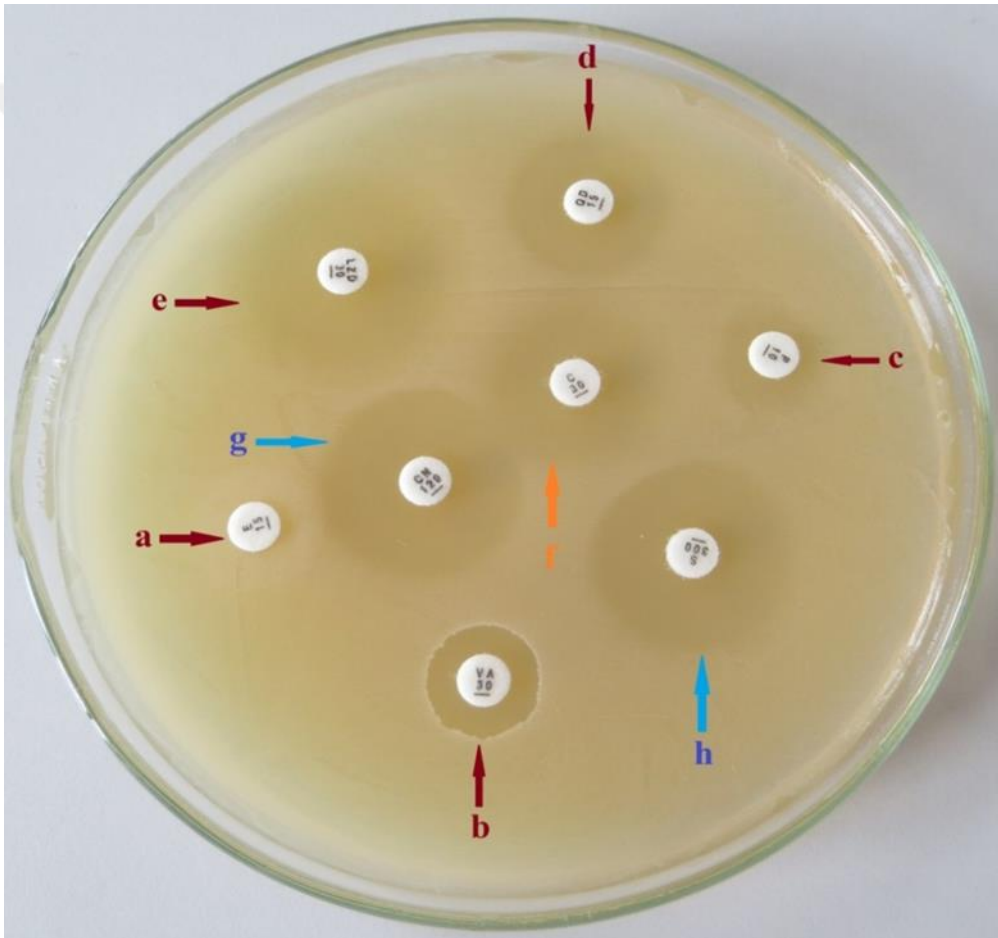
Şekil 3.3. Disk difüzyon yöntemi ile izolatlarda belirlenen vankomisin (VA-30) direnci (A, a) ve (B, b).

Çizelge 3.3. Antibiyotik direnç profillerine göre *Enterococcus* spp. izolatlarının sayısı.

Antibiyotik (µg disk ⁻¹)		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. casseliflavus</i>
E	R*	13	17	3	1	1	1
	I*	8	1	2	-	-	2
	S*	-	1	-	-	-	-
C	R*	5	3	1	-	-	-
	I*	11	12	4	1	1	2
	S*	5	4	-	-	-	1
CN	R*	1	-	-	-	-	-
	I*	2	2	1	-	-	-
	S*	18	17	4	1	1	3
P	R*	6	6	1	1	-	-
	I*	-	-	-	-	-	-
	S*	15	13	4	-	1	3
S	R*	3	2	-	-	-	1
	I*	3	3	2	-	-	-
	S*	15	14	3	1	1	2
VA	R*	18	15	5	1	1	3
	I*	3	4	-	-	-	-
	S*	-	-	-	-	-	-
LZD	R*	12	13	1	-	1	2
	I*	7	4	4	-	-	1
	S*	2	2	-	1	-	-
QD	R*	18	18	5	1	1	3
	I*	1	1	-	-	-	-
	S*	2	-	-	-	-	-

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), *R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı.

Bir *E. faecalis* (% 2) izolatu bir antibiyotiğe dirençli, 4 antibiyotiğe birden orta düzeyde dirençli ve 3 antibiyotiğe birden duyarlı olduğu saptanmıştır. İzolatların 6'sının (% 12) 2 antibiyotiğe, izolatların 15'inin (% 30) 3 antibiyotiğe, izolatların 17'sinin (% 34) 4 antibiyotiğe, izolatların 8'inin (% 16) 5 antibiyotiğe, izolatların 3'ünün (% 6) 6 antibiyotiğe birden dirençli oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.4). *Van A* ve *van B* pozitif veya negatif *Enterococcus* spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe dirençli oldukları Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Disk difüzyon yöntemi ile belirlenen 5 antibiyotiğe birden dirençli (a, b, c, d, e), bir antibiyotiğe orat düzeyde dirençli (f), 2 antibiyotiğe birden duyarlı olduğu (g, h) bir izolat.

Çizelge 3.4. Van A ve van B pozitif veya negatif *Enterococcus* spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe dirençli oldukları gösterilmiştir.

Antibiyotik sayısı	İzolat sayısı	Van A ve van B pozitif veya negatif <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı										
1	1	1 <i>E. faecalis</i>										
		Van A					Van B					
		-					-					
2	6	2 <i>E. faecalis</i>				2 <i>E. faecium</i>				2 <i>E. gallinarum</i>		
		Van A		Van B		Van A		Van B		Van A		Van B
		-		1		-		-		-		1
3	15	8 <i>E. faecalis</i>			3 <i>E. faecium</i>			2 <i>E. gallinarum</i>			2 <i>E. casseliflavus</i>	
		Van A		Van B	Van A	Van B		Van A	Van B		Van A	Van B
		3		2	-		3	1	-		-	1
4	17	5 <i>E. faecalis</i>			9 <i>E. faecium</i>		1 <i>E. durans</i>		1 <i>E. hirae</i>		1 <i>E. casseliflavus</i>	
		Van A	Van B		Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B
		-	3		2	2	-	1	-	1	-	-
5	8	3 <i>E. faecalis</i>					5 <i>E. faecium</i>					
		Van A			Van B		Van A			Van B		
		-			3		-			-		
6	3	2 <i>E. faecalis</i>					1 <i>E. gallinarum</i>					
		Van A			Van B		Van A			Van B		
		1			-		-			-		

(-): bulunmamıştır.

İzolatların 22'sinin (% 44) bir antibiyotiğe, izolatların 12'sinin (% 22) 2 antibiyotiğe, izolatların 9'ünün (% 18) 3 antibiyotiğe, bir *E. faecalis* izolatının (% 2) 4 antibiyotiğe, bir *E. faecalis* izolatının (% 2) 5 antibiyotiğe birden orta düzeyde dirençli oldukları saptanmıştır. İzolatların 5'inin (% 10) hiçbir antibiyotiğe orta düzeyde dirençli olmadıkları beirlenmiştir. Van A ve van B pozitif veya negatif *Enterococcus* spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe orta düzeyde dirençli oldukları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Van A ve van B pozitif veya negatif *Enterococcus* spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe orta düzeyde dirençli oldukları gösterilmiştir.

Antibiyotik sayısı	İzolat sayısı	Van A ve van B pozitif veya negatif <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı									
1	22	8 <i>E. faecalis</i>		10 <i>E. faecium</i>		1 <i>E. durans</i>		1 <i>E. hirae</i>		2 <i>E. casseliflavus</i>	
		Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B
		1	5	2	2	-	1	-	1	-	1
2	12	6 <i>E. faecalis</i>				4 <i>E. faecium</i>				2 <i>E. gallinarum</i>	
		Van A		Van B		Van A		Van B		Van A	Van B
		2		2		-		2		-	-
3	9	2 <i>E. faecalis</i>		3 <i>E. faecium</i>		3 <i>E. gallinarum</i>		1 <i>E. casseliflavus</i>			
		Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B	Van A	Van B		
		-	-	-	-	-	-	1	1		
4	1	1 <i>E. faecalis</i>									
		Van A					Van B				
		-					-				
5	1	1 <i>E. faecalis</i>									
		Van A					Van B				
		1					-				
0	5	3 <i>E. faecalis</i>					2 <i>E. faecium</i>				
		Van A		Van B			Van A			Van B	
		-		2			-			1	

(-): bulunmamıştır.

İzolatların 3'ünün (% 6) bir antibiyotiğe, izolatların 11'inin (% 22) 2 antibiyotiğe, izolatların 24'ünün (% 48) 3 antibiyotiğe, izolatların 8'inin (% 16) 4 antibiyotiğe ve bir *E. faecalis* izolatının (% 2) 5 antibiyotiğe birden duyarlı oldukları belirlenmiştir. İzolatların 3'ünün (% 6) hiçbir antibiyotiğe duyarlı olmadıkları saptanmıştır. Van A ve van B pozitif veya negatif *Enterococcus* spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe duyarlı oldukları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Van A ve van B pozitif veya negatif *Enterococcus* spp. izolatlarının birden; bir veya birden fazla antibiyotiğe duyarlı oldukları gösterilmiştir.

Antibiyotik sayısı	İzolat sayısı	<i>Enterococcus</i> spp. İzolatların sayısı	Van A	Van B
1	3	2 <i>E. faecalis</i>	1	-
		1 <i>E. faecium</i>	-	-
2	11	5 <i>E. faecalis</i>	-	2
		4 <i>E. faecium</i>	-	-
		1 <i>E. gallinarum</i>	1	-
		1 <i>E. casseliflavus</i>	-	-
3	24	9 <i>E. faecalis</i>	2	5
		9 <i>E. faecium</i>	2	2
		3 <i>E. gallinarum</i>	-	1
		1 <i>E. durans</i>	-	1
		1 <i>E. hirae</i>	-	1
		1 <i>E. casseliflavus</i>	-	-
4	8	5 <i>E. faecalis</i>	-	4
		2 <i>E. faecium</i>	-	1
		1 <i>E. casseliflavus</i>	-	1
5	1	1 <i>E. faecalis</i>	-	-
0	3	1 <i>E. faecalis</i>	1	-
		1 <i>E. faecium</i>	-	-
		1 <i>E. gallinarum</i>	-	-

(-): bulunmamıştır.

Enterococcus spp. izolatlarının bir veya birden fazla antibiyotik direnç ve orta düzey direnç prfilleri Çizelge 3. 7 ve Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. *Enterococcus* spp. izolatlarının bir veya birden fazla antibiyotik direnç prfilleri.

Antibiyotik (µg disk ¹)	Dirençli izolatların sayısı	Dirençli <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının türlerine göre dağılımı
E, VA, LZD	10	2'si <i>E. faecalis</i> , 6'sı <i>E. faecium</i> , 1'i <i>E. hirae</i> , 1'i <i>E. casseliflavus</i>
E, VA, QD	6	3'ü <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. faecium</i> , 2'si <i>E. gallinarum</i>
E, P, VA, LZD, QD	5	3'ü <i>E. faecalis</i> , 2'si <i>E. faecium</i>
VA, QD	5	2'si <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. faecium</i> , 2'si <i>E. gallinarum</i>
VA, LZD, QD	3	2'si <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. casseliflavus</i>
E, P, VA, QD	2	1'i <i>E. faecium</i> , 1'i <i>E. durans</i>
E, LZD, QD	2	2 <i>E. faecium</i>
E, C, P, VA, LZD, QD	1	<i>E. gallinarum</i>
E, C, S, VA, LZD, QD	1	<i>E. faecalis</i>
E, C, CN, S, VA, QD	1	<i>E. faecalis</i>
E, S, VA, LZD, QD	1	<i>E. faecium</i>
E, C, P, LZD, QD	1	<i>E. faecium</i>
E, C, P, VA, QD	1	<i>E. faecium</i>
C, VA, LZD, QD	1	<i>E. faecalis</i>
P, VA, LZD, QD	1	<i>E. faecalis</i>
E, S, LZD, QD	1	<i>E. faecalis</i>
E, C, VA, QD	1	<i>E. faecium</i>
P, VA, LZD, QD	1	<i>E. faecium</i>
E, P, LZD	1	<i>E. faecalis</i>
C, P, VA	1	<i>E. faecalis</i>
E, C, VA	1	<i>E. faecalis</i>
S, VA, QD	1	<i>E. casseliflavus</i>
E, S	1	<i>E. faecium</i>
QD	1	<i>E. faecalis</i>

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15).

Çizelge 3.8. *Enterococcus* spp. izolatlarının bir veya birden fazla antibiyotik orta düzeyde direnç profilleri.

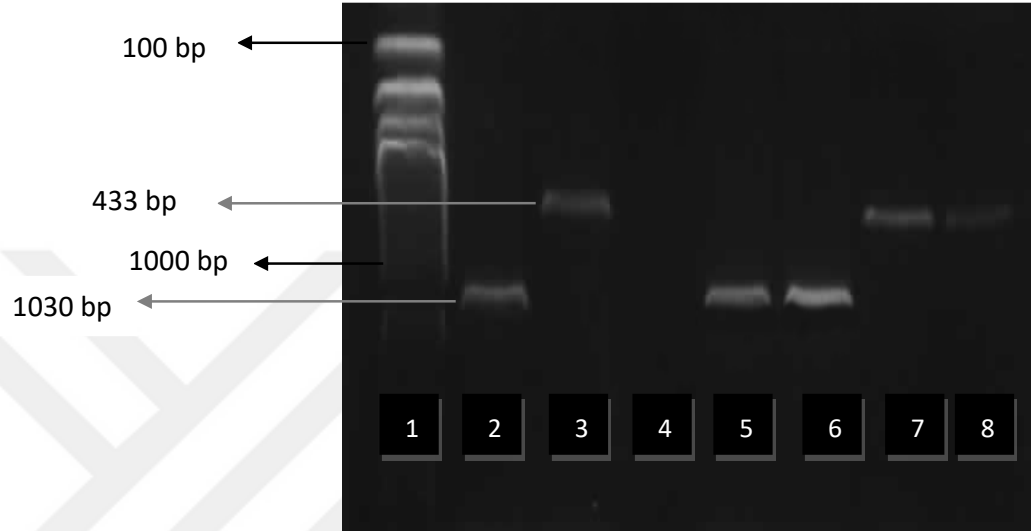
Antibiyotik (µg disk ¹)	Orta düzeyde dirençli izolatların sayısı	Orta düzeyde dirençli <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının türlere göre dağılımı
C	12	7'si <i>E. faecium</i> , 2'si <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. durans</i> , 1'i <i>E. hirae</i> , 1'i <i>E. casseliflavus</i>
LZD	5	3'ü <i>E. faecalis</i> , 2'si <i>E. faecium</i>
E, C, LZD	5	1'i <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. faecium</i> , 2'si <i>E. gallinarum</i> , 1'i <i>E. casseliflavus</i>
E	3	2'si <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. casseliflavus</i>
C, VA	3	2'si <i>E. faecium</i> , 1'i <i>E. faecalis</i>
C, LZD	3	1'i <i>E. faecalis</i> , 1'i <i>E. faecium</i> , 1'i <i>E. gallinarum</i>
E, C	2	2 <i>E. faecalis</i>
C, CN, S, VA, QD	1	<i>E. faecalis</i>
E, C, VA, LZD	1	<i>E. faecalis</i>
CN, S, VA	1	<i>E. faecium</i>
E, C, S	1	<i>E. faecalis</i>
C, CN, S	1	<i>E. faecium</i>
C, S, LZD	1	<i>E. gallinarum</i>
E, LZD	1	<i>E. faecalis</i>
C, S	1	<i>E. faecalis</i>
CN, S	1	<i>E. gallinarum</i>
VA, QD	1	<i>E. faecium</i>
S	1	<i>E. faecium</i>
CN	1	<i>E. faecalis</i>
(-)	5	3'ü <i>E. faecalis</i> , 2'si <i>E. faecium</i>

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), (-): orta düzeyde antibiyotik direnci bulunmayan izolatlar.

3.5. *E. faecalis* ve *E. faecium* İzolatlarında Multipleks PCR ile *van A* ve *van B* Genlerinin Belirlenmesi

Enterococcus spp. olarak belirlenen 50 izolatın 7'sinin (% 14) *van A*, 18'inin (% 36) *van B* geni yönünden pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 3.5).

Van A geni pozitif olan 7 hindi kuşbaşı izolatının 4'ünün *E. faecalis*, 2'sinin *E. faecium* ve 1'inin *E. gallinarum*, *van B* geni pozitif olan 18 hindi kuşbaşı izolatının ise, 9'unun *E. faecalis* 5'inin *E. faecium*, 1'inin *E. gallinarum*, 1'inin *E. durans*, 1'inin *E. hirae* ve 1'inin *E. casseliflavus* olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Multipleks PCR ile *van A* ve *van B* genleri tespit edilen *Enterococcus* spp. izolatlarının elektroforez görüntüsü (1: 100 bp DNA marker 2: Pozitif kontrol; *E. faecalis* WHO3 (*van A*⁺), 3: Pozitif kontrol *E. faecalis* WHO14 (*van B*⁺), 4: Negatif kontrol 5-6: *van A* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları 7-8: *van B* pozitif *Enterococcus* spp. izolatları).

Toplam 7 *van A* ve 18 *van B* *Enterococcus* spp. izolatının firmalara göre dağılımı Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Van A ve van B *Enterococcus* spp. izolatının firmalara göre dağılımı.

Van A ve van B <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı	Firma	Entrokok sayısı	<i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı
Van B (18)	1	4	3 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. gallinarum</i>
	2	3	1 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. faecium</i>
			1 <i>E. casseliflavus</i>
	3	3	2 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. faecium</i>
	4	1	1 <i>E. faecalis</i>
	6	2	1 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. faecium</i>
	7	1	1 <i>E. faecium</i>
	8	2	1 <i>E. faecium</i>
			1 <i>E. hirae</i>
Van A (7)	1	2	1 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. faecium</i>
	2	3	2 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. faecium</i>
	3	1	1 <i>E. gallinarum</i>
	7	1	1 <i>E. faecalis</i>
			1 <i>E. faecalis</i>

Toplam 7 van A *Enterococcus* spp. izolatının; 6'sı vankomisin (30 µg), 6'sı kinupristin-dalfopristin (15 µg), 5'i eritromisin (15 µg), 5'i linezolid (30 µg), 2'si penisilin (10 U), 1'i kloramfenikol (30 µg) ve 1'i streptomisine (300 µg) dirençli oldukları belirlenmiştir (Çizelge 3.10).

Toplam 18 van B *Enterococcus* spp. izolatının; 17'si kinupristin-dalfopristin (15 µg), 16'sı vankomisin (30 µg), 12'si eritromisin (15 µg), 12'si linezolid (30 µg), 6'sı penisilin (10 U) ve 2'si kloramfenikole (30 µg) dirençli oldukları saptanmıştır (Çizelge 3.11).

Van A ve van B pozitif *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri Çizelge 3.12, Çizelge 3.13, Çizelge 3.14, Çizelge 3.15’ te verilmiştir. *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ve MİK değerlerinin toplanan ay ve firmalara göre dağılımı Çizelge 3.16’da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Antibiyotiklere karşı dirençli van A *Enterococcus* spp. izolatlarının sayısı.

Antibiyotik (µg disk ⁻¹)	Van A <i>Enterococcus</i> spp. pozitif izolatların sayısı		
	R*	I*	S*
Eritromisin (E-15)	5	1	1
Kloramfenikol (C-30)	1	6	-
Gentamisin (CN-120)	-	2	5
Penisilin (P-10)	2	-	5
Streptomisin (S-300)	1	2	4
Vankomisin (VA-30)	6	1	-
Linezolid (LZD-30)	5	2	-
Kinupristin/dalfopristin (QD-15)	6	1	-

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

Çizelge 3.11. Antibiyotiklere karşı dirençli van B *Enterococcus* spp. izolatlarının sayısı.

Antibiyotik (µg disk ⁻¹)	Van B <i>Enterococcus</i> spp. pozitif izolatların sayısı		
	R*	I*	S*
Eritromisin (E-15)	12	6	-
Kloramfenikol (C-30)	2	9	7
Gentamisin (CN-120)	-	-	18
Penisilin (P-10)	6	-	12
Streptomisin (S-300)	-	-	18
Vankomisin (VA-30)	16	2	-
Linezolid (LZD-30)	12	4	2
Kinupristin/dalfopristin (QD-15)	17	-	1

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

Çizelge 3.12. Van A pozitif *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

Van A pozitif izolatlar	Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)		
	R*	I*	S*
<i>E. faecalis</i>	E, C, S, VA, LZD, QD	-	CN, P
<i>E. faecalis</i>	E, VA, QD	C, LZD	CN, P, S
<i>E. faecalis</i>	VA, LZD, QD	E, C	CN, P, S
<i>E. faecalis</i>	E, P, LZD	C, CN, S, VA, QD	-
<i>E. faecium</i>	P, VA, LZD, QD	C	E, CN, S
<i>E. faecium</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S
<i>E. gallinarum</i>	E, VA, QD	C, S, LZD	CN, P

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), *R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı.

Çizelge 3.13. Van B pozitif *E. faecalis* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

Van B pozitif izolatların sayısı	Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)		
	R*	I*	S*
2 <i>E. faecalis</i>	E, P, VA, LZD, QD	-	C, CN, S
1 <i>E. faecalis</i>	E, P, VA, LZD, QD	C	CN, S
1 <i>E. faecalis</i>	C, VA, LZD, QD	E	CN, P, S
1 <i>E. faecalis</i>	P, VA, LZD, QD	E, C	CN, S
1 <i>E. faecalis</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S
1 <i>E. faecalis</i>	C, P, VA	E	CN, S, LZD, QD
1 <i>E. faecalis</i>	E, VA, QD	LZD	C, CN, P, S
1 <i>E. faecalis</i>	VA, QD	E, LZD	C, CN, P, S

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı.

Çizelge 3.14. Van B pozitif *E. faecium* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

Van B pozitif izolatların sayısı	Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)		
	R*	I*	S*
2 <i>E. faecium</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S
1 <i>E. faecium</i>	E, LZD, QD	C, VA	CN, P, S
1 <i>E. faecium</i>	E, LZD, QD	C, VA	CN, P, S
1 <i>E. faecium</i>	E, VA, QD	LZD	C, CN, P, S

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı.

Çizelge 3.15. Van B pozitif *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

Van B pozitif izolatlar	Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)		
	R*	I*	S*
<i>E. hirae</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S
<i>E. casseliflavus</i>	VA, LZD, QD	E	C, CN, P, S
<i>E. durans</i>	E, P, VA, QD	C	CN, S, LZD
<i>E. gallinarum</i>	VA, QD	E, C, LZD	CN, P, S

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı.

Çizelge 3.16. *Enterococcus* spp. izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ve MİK değerlerinin toplanan ay ve firmalara göre dağılım (95,96 ve 97’inci sayfalar).

Ay	Firma	<i>Enterococcus</i> spp.	R*	I*	I*	S*	Van A	Van B	MİK
Eylül	1	2 <i>E. faecalis</i>	C, P, VA	E		CN, S, LZD, QD	-	+	4
			E, C, VA	-		CN, P, S, LZD, QD	-	-	16
	2	2 <i>E. faecium</i>	E, C, P, LZD, QD	CN, S, VA		-	-	-	-
			E, C, P, VA, QD	-		CN, S, LZD	-	-	4
			E, P, VA, LZD, QD	-		C, CN, S	-	+	4
	3	1 <i>E. faecium</i>	E, LZD, QD	C, VA		CN, P, S	-	+	1
	7	1 <i>E. faecium</i>	E, LZD, QD	C, VA		CN, P, S	-	+	0.5
Ekim	3	1 <i>E. faecalis</i>	VA, QD	E, LZD		C, CN, P, S	-	+	4
	10	1 <i>E. faecalis</i>	QD	E, C, VA, LZD		CN, P, S	-	-	-
Kasım	1	1 <i>E. faecalis</i>	E, VA, QD	C, LZD		CN, P, S	+	-	8
			E, C, VA, QD	LZD		CN, P, S	-	-	4
	2	1 <i>E. casseliflavus</i>	P, VA, LZD, QD	C		E, CN, S	+	-	0.25
			VA, LZD, QD	E		C, CN, P, S	-	+	2
	3	2 <i>E. faecalis</i>	E, S, LZD, QD	C, VA		CN, P	-	-	-
			E, VA, QD	LZD		C, CN, P, S	-	+	0.5
	5	2 <i>E. faecalis</i>	VA, QD	E, C, LZD		CN, P, S	-	-	16
			E, VA, QD	LZD		C, CN, P, S	-	-	2
	6	1 <i>E. faecium</i>	E, VA, LZD, QD	C		CN, P, S	-	+	2
			E, VA, QD	LZD		C, CN, P, S	-	+	4
	8	1 <i>E. hirae</i>	E, VA, LZD, QD	C		CN, P, S	-	+	4

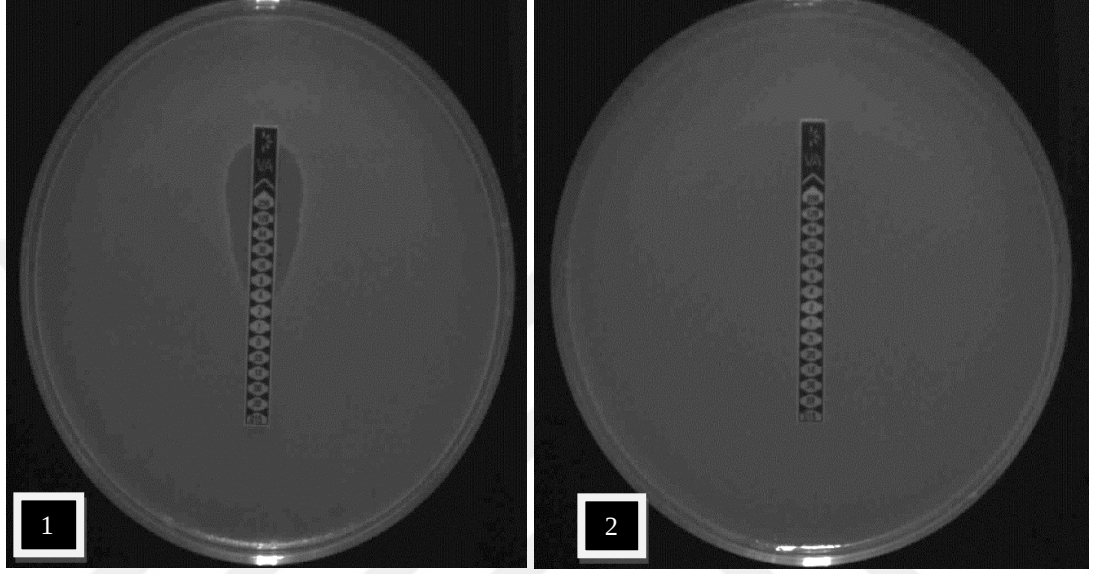
Ay	Firma	<i>Enterococcus</i> spp.	R*	I*	S*	Van A	Van B	Mik
Arahk	1	2 <i>E. faecalis</i>	E, VA, LZD, QD	C, S	CN, P	-	-	2
		1 <i>E. faecium</i>	P, VA, LZD, QD	E, C	CN, S	-	+	> 256
	2	2 <i>E. faecalis</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S	-	-	2
		1 <i>E. faecium</i>	E, C, S, VA, LZD, QD	-	CN, P	+	-	4
	3	1 <i>E. faecium</i>	VA, LZD, QD	E, C	CN, P, S	+	-	0.5
		1 <i>E. faecium</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S	-	+	> 256
	4	1 <i>E. gallinarum</i>	VA, QD	E, C, LZD	CN, P, S	-	-	2
	6	1 <i>E. faecalis</i>	E, C, CN, S, VA, QD	LZD	P	-	-	4
	7	1 <i>E. faecalis</i>	E, P, VA, LZD, QD	-	C, CN, S	-	+	> 256
	9	1 <i>E. casseliflavus</i>	S, VA, QD	E, C, LZD	CN, P	-	-	2
		1 <i>E. durans</i>	E, P, VA, QD	C	CN, S, LZD	-	-	4
		1 <i>E. gallinarum</i>	E, C, P, VA, LZD, QD	CN, S	-	-	-	2

Ay	Firma	<i>Enterococcus</i> spp.	R*	I*	S*	Van A	Van B	MİK
Ocak	1	1 <i>E. faecalis</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S	-	+	4
		3 <i>E. faecium</i>	E, P, VA, LZD, QD	C	CN, S	-	-	4
			E, P, VA, LZD, QD	S	C, CN	-	-	0.5
			E, VA, LZD, QD	C, CN, S	P	-	-	4
		2 <i>E. gallinarum</i>	E, VA, QD	C, LZD	CN, P, S	-	-	1
			VA, QD	E, C, LZD	CN, P, S	-	+	2
	2	1 <i>E. faecalis</i>	VA, LZD, QD	E, C, S	CN, P	-	-	<0.015
		2 <i>E. faecium</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S	+	-	4
			E, S	VA, QD	C, CN, P, LZD	-	-	-
	3	1 <i>E. gallinarum</i>	E, VA, QD	C, S, LZD	CN, P	+	-	8
	4	1 <i>E. faecalis</i>	E, P, VA, LZD, QD	C	CN, S	-	+	2
		1 <i>E. casseliflavus</i>	E, VA, LZD, QD	C	CN, P, S	-	-	2
		2 <i>E. faecium</i>	VA, QD	E, C, LZD	CN, P, S	-	-	2
	7	1 <i>E. faecalis</i>	E, P, LZD	C, CN, S, VA, QD	-	+	-	-
		1 <i>E. faecium</i>	E, S, VA, LZD, QD	C	CN, P	-	-	4
		1 <i>E. faecium</i>	E, P, VA, QD	C, LZD	CN, S	-	-	4
	9	1 <i>E. faecalis</i>	C, VA, LZD, QD	E	CN, P, S	-	+	2

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı.

3.6. Vankomisinin İzolatlara Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi için E Test Yöntemi

Vankomisine direnç gösteren tüm izolatlarda E test yapılarak MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İzolatlara ait E-test (1: MİK: 4 µg/ml, 2: MİK: 256 µg/ml üzeri).

MİK > 256 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 3'ünün (% 6) MİK değerleri 256 µg/ml'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 2'si *E. faecalis* ve 1'i *E. faecium* oldukları aynı zamanda her 3 izolatta da *van B* geninin bulunduğu saptanmıştır.

MİK = 16 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 2'sinin (% 4) MİK değerleri 16 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 2'si de *E. faecalis* oldukları ve *van A* veya *van B* genine sahip olmadıkları saptanmıştır.

MİK = 8 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 2'sinin (% 4) MİK değerleri 8 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 1'i *E. faecalis* ve 1'i *E. gallinarum* olduğu saptanmıştır. Bu izolatların her 2'sinde de *van A* geninin bulunduğu tespit edilmiştir

MİK = 4 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 17'sinin (% 34) MİK değerleri 4 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 7'si *E. faecalis*, 8'i *E. faecium*, 1'i *E.*

durans ve 1'i *E. hirae* oldukları tespit edilmiştir. Aynı zamanda 7 *E. faecalis* izolatının 2'sinde *van A* geni ve 4'ünde *van B* geni, 1'inde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı, 8 *E. faecium* izolatının 1'inde *van A* geni, 1'inde *van B* geni ve 6'sında ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı, *E. durans* ve *E. hirae* izolatlarının her 2'sinde de *van B* geninin bulunduğu saptanmıştır.

MİK = 2 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 14'ünün (% 28) MİK değerleri 2 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 4'ü *E. faecalis*, 4'ü *E. faecium*, 3'ü *E. gallinarum* ve 3'ü *E. casseliflavus* oldukları saptanmıştır. Aynı zamanda 4 *E. faecalis* izolatının 2'sinde, 4 *E. faecium* izolatının 1'inde, 3 *E. casseliflavus* izolatının 1'inde ve 3 *E. gallinarum* izolatının 1'inde *van B* geninin bulunduğu ve diğerlerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir.

MİK = 1 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 1'inin (% 2) MİK değeri 1 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolat *E. gallinarum*'a ait olduğu, *van A* veya *van B* genine sahip olmadığı saptanmıştır.

MİK = 0.5 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 4'ünün (% 8) MİK değerleri 0.5 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 2'si *E. faecalis* ve 2'si *E. faecium* oldukları belirlenmiştir. Aynı zamanda 2 *E. faecalis* izolatının 1'inde *van A* geni ve 1'inde *van B* geni, 2 *E. faecium* izolatının 1'inde *van B* geni bulunurken diğerinde ise *van A* veya *van B* geni bulunmamıştır.

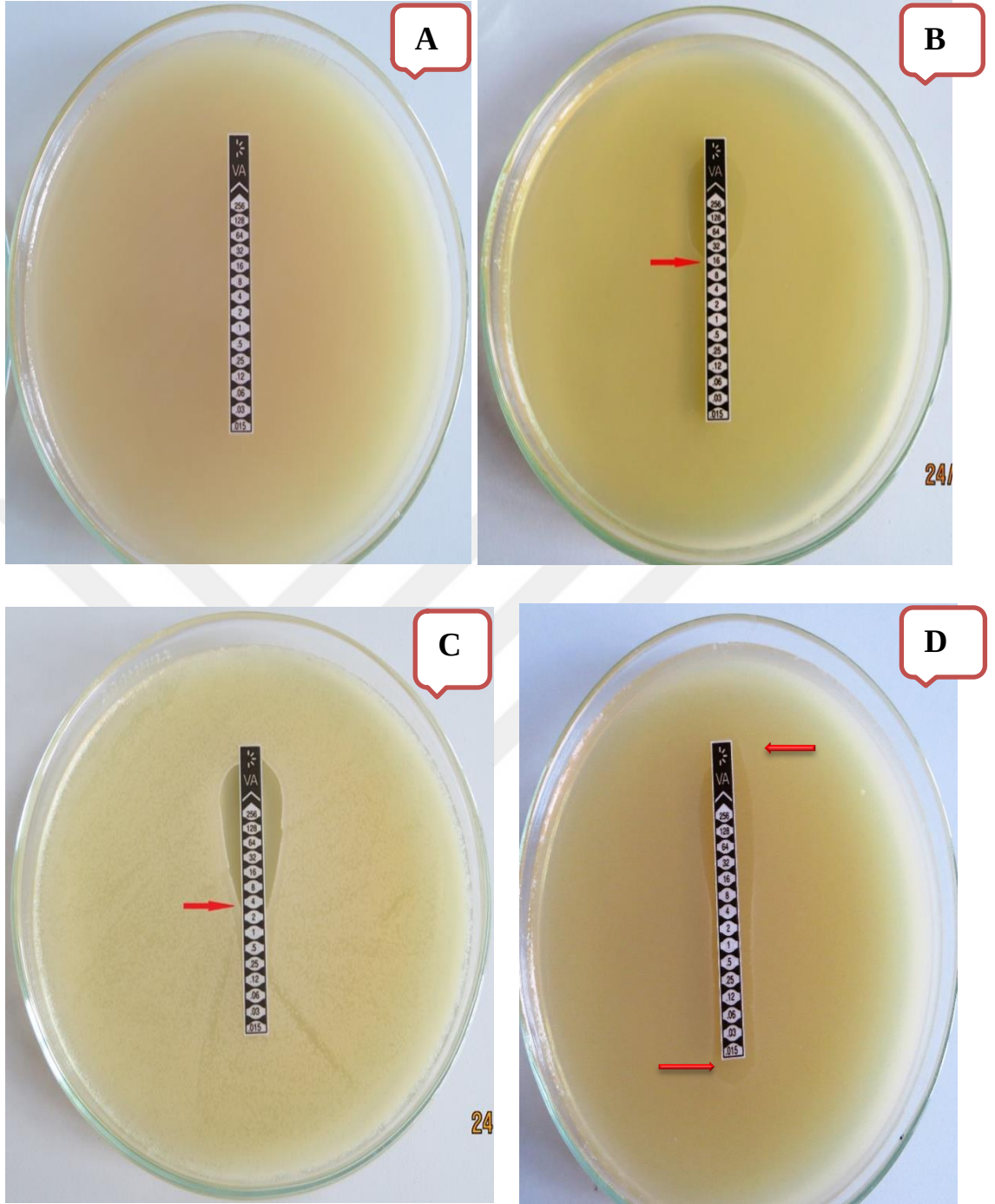
MİK = 0.25 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 1'inin (% 2) MİK değeri 0.25 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Bu izolat *E. faecium*'a ait olduğu aynı zamanda *van A* genine sahip olduğu saptanmıştır.

MİK < 0.015 µg/ml; *Enterococcus* spp. izolatlarından 1'inin (% 2) MİK değeri 0.015 µg/ml'nin altında olduğu belirlenmiştir. Bu izolat *E. faecalis*'e ait olduğu, *van A* veya *van B* genine sahip olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.7). *Enterococcus* spp. izolatlarının firmalara göre MİK değerleri Çizelge 3.17'de verilmiştir.

Çizelge 3.17. *Enterococcus* spp. izolatlarının firmalara göre MİK değerleri

MİK	<i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının sayısı		Van A	Van B	Firma
> 256 µg/ml	3 (% 6)	2 <i>E. faecalis</i>	-	2	1, 6
		1 <i>E. faecium</i>	-	1	2
16 µg/ml	2 (% 4)	2 <i>E. faecalis</i>	-	-	1, 5
8 µg/ml	2 (% 4)	1 <i>E. faecalis</i>	1	-	1
		1 <i>E. gallinarum</i>	1	-	3
4 µg/ml	17 (% 34)	7 <i>E. faecalis</i>	2	4	van A 2, 7
					van B 2'si birinci firma, 2, 3
					van (-) 4
		8 <i>E. faecium</i> ,	1	1	van A 2
					van B 8
					van (-) 4'ü birinci firma, 7, 8
		1 <i>E. durans</i>	-	1	9
		1 <i>E. hirae</i>	-	1	8
2 µg/ml	14 (% 28)	4 <i>E. faecalis</i>	-	2	van B 4, 9
					van (-) 1, 5
		4 <i>E. faecium</i>	-	1	van B 6
					van (-) 1, 2'si altıncı firma
		3 <i>E. gallinarum</i>	-	1	van B 1
					van (-) 3, 9
		3 <i>E. casseliflavus</i>	-	1	van B 2
					van (-) 4, 7
1 µg/ml	1 (% 2)	<i>E. gallinarum</i>	-	-	1
0.5 µg/ml	4 (% 8)	2 <i>E. faecalis</i>	1	1	van A 2
					van B 3
		2 <i>E. faecium</i>	-	1	van B 7
					van (-) 1
0.25 µg/ml	1 (% 2)	<i>E. faecium</i>	1	-	1
<0.015µg/ml	1 (% 2)	<i>E. faecalis</i>	-	-	2

(-): van A veya van B geni bulunmamıştır.



Şekil 3.7. İzolatlara ait A: E-test (MİK > 256 µg/ml), B: E-test (MİK: 16 µg/ml), C: E-test (MİK: 4 µg/ml), D: E-test (MİK < 0.015 µg/ml).

4. TARTIŞMA

Enterokoklar kontamine sular ile sulanmış bitkiler, atık sular, dışkıları gibi çeşitli kaynaklardan ve çevresel kontaminasyon yoluyla gıdalara bulaşabilmektedir. Diğer yandan, kesim yerlerindeki hijyen eksikliği sonucunda karkaslar bağırsak içeriği ile kontamine olarak hayvansal gıdaların bu mikroorganizmalar ve dirençli türleri için bir vektör olmasına neden olabilmektedir (Giraffa, 2002; Lemcke ve Bülte, 2000).

Bu çalışma kapsamında toplam 100 örnekte yapılan analiz sonuçlarına göre 50 örneğin (% 50) *Enterococcus* spp. pozitif olduğu saptanmıştır. Eylül, Ekim, Kasım, Aralık ve Ocak aylarında toplam 10 firmadan toplanan bu izolatların 7'si Eylül, 2'si Ekim, 11'i Kasım, 12'si Aralık ve 18'i Ocak ayına ait olduğu belirlenmiştir. Hindi etlerinde dünya genelinde yapılan çalışma sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. prevalansının oldukça yüksek olduğu bildirilmektedir. İzolatlardan yapılan serotip çalışmalarına göre en sık rastlanan serotiplerin başta *E. faecalis* ve *E. faecium* olmak üzere *E. durans*, *E.hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* olduğu rapor edilmektedir (Lemcke ve Bülte, 2000; Robredo ve ark., 2000; Messi ve ark., 2006; Miranda ve ark., 2007; Kasımoğlu Doğru ve ark., 2010).

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

Robredo ve ark. (2000), tarafından yapılan bir çalışmada 1997-1998 yılları arasında farklı marketlerden toplanan 100 tavuk eti ürünleri, haşlanmış jambon ve hindi et örneği vankomisine dirençli enterokoklar yönünden analiz edilmiştir. Bu çalışmada toplam 92 tavuk eti ürünlerinin 25'inde vankomisine dirençli enterokok izole edilirken, pişmiş domuz eti veya hindi eti ürünlerinde vankomisine dirençli enterokok izole edilememiştir. Vankomisine dirençli enterokokların 10'u *E.*

faecalis, 10'u *E. faecium*, 11'i *E. durans*, 2'sı *E. hirae* olarak bildirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen verilere göre *Enterococcus* spp. olarak belirlenen 50 örneğin *Enterococcus* spp. olarak belirlenen 50 örneğin 21'i (% 42) *E. faecalis*, 19'u (% 38) *E. faecium*, 5'i (% 10) *E. gallinarum*, 1'i (% 2) *E. durans*, 1'i (% 2) *E. hirae*, 3'ü (% 6) ise *E. casseliflavus* olarak identifiye edilmiştir.

Mart 2001-haziran 2002 yılları arasında Iowa eyaletinde yapılan bir çalışmada 263 marketden toplanan 981 tavuk, hindi, domuz ve sığır eti örneğinde *Enterococcus* spp. varlığına bakılmıştır. Toplam 981 örneğin 227'si hindi eti, 237'si tavuk et, 255'i domuz eti ve 262'si sığır eti olduğu bildirilmiştir. PCR analizi ile hindi eti örneğinin 226'sında (% 99.6), tavuk eti örneğinin 236'sında (% 99.6), domuz eti örneğinin 247'sinde (% 99.9) ve sığır et örneğinin 262'sinde (% 100) *Enterococcus* spp. bulunmuştur. Söz konusu çalışmada *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*'un daha çok hindi etlerinden, *E. durans* ve *E. hirae*'nin daha çok sığır etlerinden izole edildiği bildirilmiştir Bu çalışmada; multipleks PCR ile toplam 227 hindi eti örneğinden 356 *Enterococcus* spp. izolatu identifiye edilmiştir. Bu isolatların 1'i *E. avium*, 21'i *E. casseliflavus*, 110'u *E. faecalis*, 213'ü *E. faecium*, 6'sı *E. gallinarum*, 3'ü *E. hirae* olarak tanımlanırken, 3'ü tanımlanmamıştır (Hayes ve ark., 2003).

Mayıs 2007-Nisan 2008 tarihleri arası yapılan başka bir çalışmada toplanan 134 sığır, 206 tavuk ve 91 hindi eti örneğinde, tavuk ve hindi etlerinin % 94'ünde ve sığır etlerinin % 73'ünde *E. faecalis* izole edilirken, *E. hirae* ve *E. faecium* hindi etlerinde saptanamamıştır. Tavuk etlerinin % 4'ünde, sığır etlerinin ise % 2'sinde *E. faecium* izole edilmiştir (Aslam ve ark., 2012).

Çalışma kapsamında hindi kuşbaşı örneklerinde *Enterococcus* spp. olarak identifiye edilen 50 izolatin 21'inin (% 42) *E. faecalis*, 19'unun (% 38) *E. faecium*, 5'inin (% 10) *E. gallinarum*, 1'inin (% 2) *E. durans* olduğu belirlenmiştir. Hindi örneklerinde *E. faecalis* olarak belirlenen örneklerin 6'sının aynı firmaya, *E. faecium* olarak belirlenenlerin ise 8'inin aynı firmaya, diğerlerinin ise farklı firmalara ait olduğu belirlenmiştir. Hindi etlerinden izole edilen *Enterococcus* spp.'lerin firma bazında daha yüksek oranda benzerlik göstermesi, hindi eti

üretiminin sınırlı sayıda firma tarafından yapılıyor olmasına bağlanmıştır. Aynı zamanda, hindi etlerinin *Enterococcus* spp. ile daha yüksek oranda kontamine olması, hindilerin kesim ağırlığına erişmesi için geçen zamanın uzun olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kendi içlerinde aynı firmalara ait hindi örneklerinden izole edilen vankomisin direnç genlerinin ve MİK değerlerinin benzerlik göstermemesi, kontaminasyonun farklı aşamalarda gerçekleşmiş olabileceğini göstermiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre, *Enterococcus* spp. olarak belirlenen 50 izolatın 7'sinin (% 14) van A, 18'inin (% 36) van B geni yönünden pozitif olduğu saptanmıştır (Şekil 3.15). Van A geni pozitif bulunan 7 hindi kuşbaşı izolatının 4'ünün *E. faecalis*, 2'sinin *E. faecium*, 1'inin *E. gallinarum*, van B geni pozitif bulunan 18 hindi kuşbaşı izolatının ise, 9'unun *E. faecalis* 5'inin *E. faecium*, 1'inin *E. gallinarum*, 1'inin *E. durans*, 1'inin *E. hirae*, 1'inin *E. casseliflavus* izolatı olduğu belirlenmiştir. Messi ve ark. (2006), toplam 59 et izolatının % 35'inde vankomisine dirençli enterokok izole edildiğini bildirmiştir. Bu izolatların % 10.7'sinde van A ve % 8.3'ünde van B izole edilmiştir. Bu çalışmadaki toplam 18 van A izolatının 11'i *E. faecium*, 3'ü *E. faecalis*, 3'ü *E. casseliflavus* ve biri *E. gallinarum* olarak bildirilmiştir. Yine toplam 14 van B izolatının 5'i *E. faecalis*, 9'u *E. faecium* olarak bildirilmiştir.

Jung ve ark. (2007) tarafından yapılan bir başka çalışmada 2003 yılının Mart-Kasım ayları arasında Kore'nin çeşitli bölgelerinden 100 kanatlı eti 50 domuz eti ve 50 sığır eti örneği toplanmıştır. Bu çalışmadaki toplam 100 kanatlı eti örneğinin 44'ü ve 50 sığır eti örneğinin 1'i van A pozitif olarak izole edilmiştir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada, toplam 100 et (sığır, tavuk, hindi, kuzu ve domuz eti) örneğinde enterokok varlığına ve izolatların antibiyotik direncine (özellikle vankomisin direncine) bakılmıştır. Bu örneklerin 30'u sığır eti, 26'sı tavuk eti, 24'ü domuz eti, 16'sı hindi eti ve 4'ü kuzu eti olduğu bildirilmiştir. Bu örneklerden elde edilen toplam 45 *Enterococcus* spp. izolatının 17'si tavuk eti örneğine, 12'si sığır eti örneğine, 8'i domuz eti örneğine, 5'i hindi eti örneğine ve 3'ü domuz eti örneğine ait olduğu saptanmıştır. Toplam 45 *Enterococcus* spp. izolatının 29'u vankomisine dirençli (VRE) ve 30'u teikoplanine dirençli (TRE)

olduğu tespit edilmiştir. Yine toplam 29 vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 13'ü tavuk eti örneğine, 6'sı sığır eti örneğine, 5'i domuz eti örneğine, 3'ü hindi eti örneğine ve 2'si kuzu eti örneğine ait olduğu saptanmıştır. Toplam 30 teikoplanine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 13'ü tavuk eti örneğine, 6'sı sığır eti örneğine, 6'sı domuz eti örneğine, 3'ü hindi eti örneğine ve 2'si kuzu eti örneğine ait olduğu bildirilmiştir. Toplam 45 *Enterococcus* spp. izolatının; 16'sı *E. faecium*, 15'i *E. faecalis*, 3'ü *E. gallinarum*, 3'ü *E. durans*, 2'si *E. casseliflavus* ve 6'sı diğer enterokok türleri olduğu saptanmıştır (Pavia ve ark., 2000).

Aynı çalışmada; toplam 29 vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 12'si *E. faecium*, 6'sı *E. faecalis*, 3'ü *E. gallinarum*, 2'si *E. durans*, 1'i *E. casseliflavus*, 5'i diğer enterokok türleri ve toplam 30 teikoplanine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 12'si *E. faecium*, 7'si *E. faecalis*, 3'ü *E. gallinarum*, 2'si *E. durans*, 1'i *E. casseliflavus*, 5'i diğer enterokok türleri olduğu belirtilmiştir. Yine toplam 45 *Enterococcus* spp. izolatının; % 17.8'i ampiciline, % 88.9'u metisiline, % 71.1'i seftriaksona, % 22.2'si imipeneme, % 64.4'ü vankomisine, % 66.7'si teikoplanine, % 66.7'si gentamisine, % 88.9'u streptomisine, % 75.6'sı eritromisine, % 84.4'ü tetrasikline, % 55.6'sı siprofloksasine, % 42.2'si kloramfenikola, % 15.6'sı rifampine, % 31.1'i trimetoprim-sulfametoksazola dirençli oldukları saptanmıştır (Pavia ve ark., 2000).

İspanya'da yapılan bir başka çalışmada; toplam 160 et örneğinde vankomisine dirençli enterokoklar incelenmiştir. Bu örneklerin 80'i hindi ve tavuk eti, 40'ı domuz eti, 40'ı sığır eti örneğine ait olduğu bildirilmiştir. Toplam 160 et örneğinin 38'i (% 23.8), vankomisine dirençli enterokoklara ait olduğu saptanmıştır. Toplam 38 vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 30'u kanatlı eti örneğine (hindi ve tavuk eti), 6'sı domuz ei örneğine , 2'si sığır eti örneğine ait olduğu tespit edilmiştir.

PCR yöntemi ile tanımlanan 38 vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 14'ü *E. faecium*, 10'u *E. durans*, 7'si *E. hirae*, 5'i *E. gallinarum*, 2'si *E. casseliflavus* olduğu bildirilmiştir. Toplam 30 kanatlı (hindi ve tavuk) vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 10'u *E. faecium*, 9'u *E. durans*, 6'sı *E. hirae*, 3'ü *E. gallinarum*, 2'si *E. casseliflavus* olduğu belirtilmiştir. Yine toplam 6 domuz vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 3'ü *E. faecium*, 1'i *E. durans*,

1'i *E. hirae* ve 1'i *E. gallinarum*, toplam 2 sığır vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. izolatının; 1'i *E. faecium* ve 1'i *E. gallinarum* olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada toplam 38 vankomisin dirençli *Enterococcus* spp. izolatının 27'si *van A* genine, 1'i *vanB* genine, 7'si *vanC-1* genine, 2'si *vanC-2/3* genine sahip oldukları saptanmıştır (Guerrero-Ramos ve ark., 2016).

Aynı çalışmada; toplam 27 *van A* genine sahip *Enterococcus* spp. izolatının; 10'u *E. faecium*, 10'u *E. durans* ve 7'si *E. hirae* olduğu saptanmıştır. Toplam 10 *van A E. faecium* izolatının; 7'si kanatlı eti (hindi ve tavuk eti) örneğine, 2'si domuz eti örneğine ve 1'i sığır eti örneğine, toplam 10 *van A E. durans* izolatının; 9'u kanatlı eti (hindi ve tavuk eti) örneğine ve 1'i domuz eti örneğine, toplam 7 *van A E. hirae* izolatının; 6'sı kanatlı eti (hindi ve tavuk eti) örneğine ve 1'i domuz eti örneğine ait olduğu bildirilmiştir. *Van B* geni ise sadece bir kanatlı eti (hindi ve tavuk eti) *E. faecium* izolatında bulunmuştur. Toplam 7 *van C-1 E. gallinarum* izolatının; 3'ü kanatlı eti (hindi ve tavuk eti) örneğine, 1'i domuz eti örneğine ve 1'i sığır eti örneğine ait olduğu saptanmıştır. *Van C-2/3* geni ise 2 kanatlı eti (hindi ve tavuk) *E. casseliflavus* izolatında bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada; kanatlı eti (hindi ve tavuk eti) vankomisin dirençli *Enterococcus* spp. izolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Guerrero-Ramos ve ark., 2016).

Klare ve ark. (1999)'un yapmış olduğu çalışmada; toplam 31 kanatlı eti örneğinde *van A* pozitif vankomisin dirençli enterokoklara bakılmıştır. Bu çalışmada toplam 31 kanatlı eti örneğin 24'ü tavuk eti ve 7'si hindi eti örneğine ait olduğu bildirilmiştir. Toplam 24 tavuk eti örneğinin 22'si dondurulmuş ve 2'si taze tavuk eti örneği, toplam 7 hindi eti örneğinin 6'si dondurulmuş ve 1'i taze hindi eti örneği olduğu belirtilmiştir. Bu örneklerin 8'inde (% 26) *van A* geninin bulunduğu tespit edilmiştir. Toplam 8 *van A* pozitif vankomisin dirençli enterokok izolatının 7'si tavuk eti ve 1'i hindi eti örneğine ait olduğu saptanmıştır. Diğer 23 kanatlı eti örneğinde *van A* geni bulunmamıştır (Klare ve ark., 1999).

Danimarka'da 2005-2006 yılları arası yapılan başka bir çalışmada; toplam 3116 kanatlı eti örneğinde vankomisine dirençli *E. faecalis* incelenmiştir. Bu örneklerin 2209'u tavuk eti örneği ve 907'si hindi eti örneği olduğu bildirilmiştir.

Hindi eti izolatlarının 3'ünde (% 0.7) vankomisine dirençli *E. faecalis* saptanırken tavuk eti izolatlarında vankomisine dirençli *E. faecalis* bulunmamıştır. Bu çalışmada hindi eti izolatlarında vankomisine ve teikoplanine dirençli *E. faecalis*'ler, *van A*, *tet* (M) ve *erm* (B) genleri tarafından kodlandıkları saptanmıştır (Agersø ve ark., 2008).

İzolatların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılan analiz sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. izolatlarının panelde bulunan 8 antibiyotiğe yüksek oranda dirençli ve/veya orta düzeyde dirençli oldukları dikkati çekmektedir (Çizelge 3.2). İzolatların 1'inin (% 2) bir antibiyotiğe, 6'sının (% 12) 2 antibiyotiğe, 15'inin (% 30) 3 antibiyotiğe, 17'sinin (% 34) 4 antibiyotiğe, 8'inin (% 16) 5 antibiyotiğe, 3'ünün (% 6) 6 antibiyotiğe birden dirençli oldukları saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre izolatların % 22'sinin çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları (5 ve üzeri) belirlenmiştir. *Enterococcus* spp. izolatlarından 47'sinin (% 94) vankomisine karşı dirençli, 7'sinin (% 14) vankomisine karşı orta düzeyde dirençli olduğu saptanmıştır. İzolatların % 70 ve üzerinde bir oranla eritromisin, vankomisin ve kinupristin/dalfopristine dirençli oldukları belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında; birinci firmadan toplam 6 *E. faecalis* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların 3'ü 3 antibiyotiğe ve 3'ü 4 antibiyotiğe birden dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların hepsi vankomisine dirençli oldukları belirlenmiştir. Yine bu izolatların 1'inde *van A*, 3'ünde *van B* geni saptanırken 2'sinde *van A* veya *van B* geni bulunmamıştır. İkinci firmadan toplanan 4 *E. faecalis* izolatın 2'si 3 antibiyotiğe, 1'i 5 antibiyotiğe ve 1'i 6 antibiyotiğe birden dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların hepsi vankomisine dirençli oldukları, 2'sinde *van A* geni ve 1'inde *van B* geni bulunurken 1'inde ise *van A* veya *van B* geni bulunmamıştır.

Üçüncü firmadan toplanan 3 *E. faecalis* izolatın 1'i 2 antibiyotiğe, 1'i 3 antibiyotiğe ve 1'i 4 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, 2'si vankomisine dirençli ve 1'i vankomisine orta düzeyde dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların 2'sinde *van B* geni bulunurken 1'inde *van A* veya *van B* geni

bulunmamıştır. Dördüncü firmadan toplanan 2 *E. faecalis* izolatın 1'i 5 antibiyotiğe birden dirençli olduğu aynı zamanda *van B* genine sahip olduğu, 1'i 6 antibiyotiğe birden dirençli olduğu ve *van A* veya *van B* gennei sahip olmadığı belirlenmiştir. Her iki izolt vankomisine dirençli oldukları saptanmıştır.

Beşinci firmadan toplanan 2 *E. faecalis* izolatın 1'i 2 antibiyotiğe ve 1'i 3 antibiyotiğe birden dirençli oldukları ve *van A* veya *van B* genine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Her iki izolt vankomisine dirençli oldukları saptanmıştır. Toplam 4 *E. faecalis* izolatı 6, 7, 9 ve 10'uncu firmalardan elde edilmiştir. Altı ve 9'uncü firmalarına ait izolatlar vankomisine dirençli ve aynı zamanda *van B* genine sahip oldukları, 7 ve 10'uncu firmalarına ait izolatlar vankomisine orta düzeyde dirençli oldukları saptanmıştır. Yedinci firmaya ait *E. faecalis* izolatı *van A* genine sahip olduğu, 10'uncu firmaya ait izolat ise *van A* veya *van B* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. Altıncı firmaya ait *E. faecalis* izolatı 5 antibiyotiğe ve 7'inci firmaya ait izolat 3 antibiyotiğe, 9'uncu firmaya ait izolat 4 antibiyotiğe ve 10'uncu firmaya ait izolat bir antibiyotiğe birden dirençli oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *E. faecalis* izolatlarının firmalara göre antibiyotik direç profilleri.

Firma	<i>E. faecalis</i>	Van	Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)	
			R*	I*
1	6	van A	E, VA, QD	C, LZD
		van B	C, P, VA	E
			P, VA, LZD, QD	E, C
			E, VA, LZD, QD	C
		van -	E, VA, LZD, QD	C, S
			E, C, VA	-
2	4	van A	VA, LZD, QD	E, C
			E, C, S, VA, LZD, QD	CN
		van B	E, P, VA, LZD, QD	-
		van -	VA, LZD, QD	E, C, S
3	3	van B	VA, QD	E, LZD
			E, VA, QD	LZD
		van -	E, S, LZD, QD	C, VA
4	2	van B	E, P, VA, LZD, QD	C
		van -	E, C, CN, S, VA, QD	LZD
5	2	van -	VA, QD	E, C, LZD
		van -	E, VA, QD	LZD
6	1	van B	E, P, VA, LZD, QD	-
7	1	van A	E, P, LZD	C, CN, S, VA, QD
9	1	van B	C, VA, LZD, QD	E
10	1	van -	QD	E, C, VA, LZD

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı, van -: van A veya van B geni bulunmayan izolatlar.

Çalışma kapsamında; birinci firmaya ait toplam 8 *E. faecium* izolatının 4'ü 4 antibiyotiğe ve 4'ü 5 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların 7'si vankomisine dirençli ve biri ise vankomisine orta düzeyde dirençli olduğu

saptanmıştır. Bu izolatların 1'inde *van A* geninin bulunduğu diğerlerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir.

İkinci firmaya ait 3 *E. faecium* izolatının 2'ü 4 antibiyotiğe ve 1'i 2 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların 2'si vankomisine dirençli ve 1'i vankomisine orta düzeyde dirençli olduğu saptanmıştır. İzolatların 1'inde *van A* geni, 1'inde *van B* geninin bulunduğu ve diğerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı tespit edilmiştir. Üçünü firmaya ait *E. faecium* izolatı 3 antibiyotiğe birden dirençli olduğu, *van B* genine sahip olduğu ve vankomisine orta düzeyde dirençli olduğu saptanmıştır.

Altıncı firmaya ait toplam 3 *E. faecium* izolatının 2'si 4 antibiyotiğe ve 1'i 2 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların hepsi vankomisine dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların 1'inde *van B* geninin bulunduğu diğerlerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir.

Yedinci firmaya ait toplam 2 *E. faecium* izolatının 1'i 3 antibiyotiğe ve 1'i 5 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların biri vankomisine dirençli, biri ise vankomisine orta düzeyde dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların 1'inde *van B* geninin bulunduğu diğerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir.

Sekizinci firmaya ait toplam 2 *E. faecium* izolatının 1'i 3 antibiyotiğe ve 1'i 4 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların 2'side vankomisine dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların 1'inde *van B* geninin bulunduğu diğerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *E. faecium* izolatlarının firmalara göre antibiyotik direç profilleri.

Firma	<i>E. faecium</i>	Van	Antibiyotik (µg disk ⁻¹)	
			R*	I*
1	8	van A	P, VA, LZD, QD	C
		van -	E, C, VA, QD	LZD
			E, VA, LZD, QD	C
			E, VA, LZD, QD	C, CN, S
			E, C, P, LZD, QD	CN, S, VA
			E, C, P, VA, QD	-
			E, P, VA, LZD, QD	C
			E, P, VA, LZD, QD	S
2	3	van A	E, VA, LZD, QD	C
		van B	E, VA, LZD, QD	-
		van -	E, S	VA, QD
3	1	van B	E, LZD, QD	C, VA
6	3	van B	E, VA, LZD, QD	C
		van -	E, VA, LZD, QD	C
			VA, QD	E, C, LZD
7	2	van B	E, LZD, QD	C, VA
		van -	E, S, VA, LZD, QD	C
8	2	van B	E, VA, QD	LZD
		van -	E, P, VA, QD	C, LZD

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı, van -: van A veya van B geni bulunmayan izolatlar.

Çalışmada; birinci firmaya ait toplam 2 *E. gallinarum* izolatının 1'i 2 antibiyotiğe ve 1'i 3 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların 2'side vankomisine dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların 1'inde van B geninin bulunduğu diğerinde ise van A veya van B geninin bulunmadığı belirlenmiştir.

Üçüncü firmaya ait toplam 2 *E. gallinarum* izolatının 1'i 2 antibiyotiğe ve 1'i 3 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, izolatların 2'side vankomisine dirençli oldukları saptanmıştır. Bu izolatların 1'inde *van A* geninin bulunduğu diğerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir.

Dokuzuncu firmaya ait vankomisine dirençli *E. gallinarum* izolatı 6 antibiyotiğe birden dirençli olduğu, *van A* veya *van B* genine sahip olmadığı saptanmıştır. Dokuzuncu firmaya ait vankomisine dirençli *E. durans* izolatı 4 antibiyotiğe birden dirençli olduğu, *van B* genine sahip olduğu saptanmıştır. Sekizinci firmaya ait vankomisine dirençli *E. hirae* izolatı 4 antibiyotiğe birden dirençli olduğu, *van B* genine sahip olduğu saptanmıştır.

Toplam 3 vankomisine dirençli *E. casseliflavus* izolatı, 2, 4 ve 7'inci firmalara ait oldukları saptanmıştır. Bu izolatların 2'si 3 antibiyotiğe ve 1'i 4 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, 1'inde *van B* geninin bulunduğu diğerlerinde ise *van A* veya *van B* geninin bulunmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. casseliflavus* izolatlarının firmalara göre antibiyotik direç profilleri.

<i>Enterococcus</i> spp.	Firma	Van	Antibiyotik ($\mu\text{g disk}^{-1}$)	
			R*	I*
<i>E. gallinarum</i>	1	van B	VA, QD	E, C, LZD
		van -	E, VA, QD	C, LZD
	3	van A	E, VA, QD	C, S, LZD
		van -	VA, QD	E, C, LZD
	9	van -	E, C, P, VA, LZD, QD	CN, S
<i>E. durans</i>	9	van B	E, P, VA, QD	C
<i>E. hirae</i>	8	van B	E, VA, LZD, QD	C
<i>E. casseliflavus</i>	2	van B	VA, LZD, QD	E
	4	van -	E, VA, LZD, QD	C
	7	van -	S, VA, QD	E, C, LZD

E: Eritromisin (E-15), C: Kloramfenikol (C-30), CN: Gentamisin (CN-120), P: Penisilin (P-10), S: Streptomisin (S-300), VA: Vankomisin (VA-30), LZD: Linezolid (LZD-30), QD: Kinupristin/dalfopristin (QD-15), * R: Dirençli; I: Orta düzeyde dirençli; S: Duyarlı, van -: van A veya van B geni bulunmayan izolatlar.

Konuyla ilgili literatürler incelendiğinde, çalışma bulgularındakilere benzer ve aynı gruplardaki antibiyotiklere karşı direnç profillerine sahip oldukları görülmüştür (Messi ve ark., 2006; Trivedi ve ark., 2011; Pesavento ve ark., 2014). Hindi etlerinde vankomisine karşı olan direncin tavuk etlerinden daha fazla bulunması da yine, hindilerin kesim ağırlığına erişmesi için geçen zamanın tavuklarınkinden daha uzun olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Georgia eyaletinde 2000-2001 yıllar arası yapılan bir çalışmada, gıda maddelerinde (sebze, meyve ve et örneklerinde) enterokok varlığı incelenmiştir. Toplam 396 gıda örneğinin 189'unda (% 47.7) enterokok bulunmuştur. Yine toplam 92 et örneğinin 22'si tavuk etine, 22'si sığır etine, 21'i hindi etine, 22'si domuz etine, 2'si hazır yemek ürünlerine, 3'ü bufalo, devekuşu ve tavuk ciğerine ait olduğu bildirilmiştir. Hindi eti örneklerinin 20'sinde (% 95), tavuk eti

örneklerinin 21'inde (% 95), sığır eti örneklerinin 16'sında (% 73), ve domuz eti örneklerin 15'inde (% 68), bufalo, devekuşu ve tavuk ciğeri örneklerinin 1'inde enterokok izole edilmiştir.

Hazır yemek ürünlerinde enterokok bulunmamıştır. Et örneklerinde *E. faecalis* (n = 80), meyve ve sebze örneklerinde *E. casseliflavus* (n = 66) baskın enterokok türü olarak saptanmıştır. Bu çalışmada 20 hindi *Enterococcus* spp. izolatının 17'si *E. faecalis*, 1'i *E. faecium*, 1'i *E. durans*, 1'i *E. hirae* olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada; et örneklerinde bulunan *E. faecalis* izolatlarının 41'i basitrasin, 2'si kloramfenikol, 2'si siprofloksasin, 12'si eritromisin, 3'ü flavomisin, 10'ü gentamisin, 20'si kanamisin, 53'ü linkomisin, , 1'i penisilin, , 24'ü streptomisin, 54'ü sinersid, 37'si tetrasiklin, 13'ü tilosin dirençli oldukları bildirilmiştir. Yine et örneklerinde bulunan *E. faecium* izolatlarının 4'ü basitrasin, 2'si siprofloksasin, 4'ü flavomisin, 1'i gentamisin, 4'ü kanamisin, 3'ü linkomisin, 2'si nitrofurantoin, 1'i penisilin, 2'si streptomisin, 3'ü sinersid, 2'si tetrasiklin, 1'i tilosin dirençli oldukları saptanmıştır (McGowan ve ark., 2006).

Yapılan başka bir çalışmada; 2005 yılında toplam 90 paketlenmiş tavuk ve hindi eti örneği incelenmiştir. Bu örneklerin 30'u hindi etine, 30'u tavuk etine ve 30'u organik tavuk etine ait oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada toplam 180 *Enterococcus* spp. izolatının 60'ı hindi eti, 60'ı tavuk eti, 60'ı organik tavuk eti oldukları ve disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç testi yapılmıştır. Toplam 60 organik tavuk eti izolatının % 36.67'si *E. faecalis*, % 31.67'si *E. durans*, % 6.67'si *E. casseliflavus*, , % 6.67'si *E. gallinarum* , % 1.67'si *E. faecium*, % 5'i *Aerococcus* spp. , % 3.33'ü *Lactococcus* spp. , % 8.33'ü tanımlanmamış olduğu bildirilmiştir. Yine toplam 60 tavuk eti izolatının % 58.33'ü *E. durans*, % 21.67'si *E. faecalis*, % 1.67'si *E. avium*, % 1.67'si *E. faecium*, % 1.67'si *E. hirae* , % 5'i *Lactococcus* spp. , % 5'i *Aerococcus* spp., % 1.67'si *Leuconostoc* spp. ve 3.33'ü tanımlanmamış olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada; toplam 60 hindi eti izolatının % 56.67'si *E. durans*, % 36.67'si *E. faecalis*, % 1.67'si *E. gallinarum*, % 5'i *Aerococcus* spp. olduğu saptanmıştır. Organik tavuk eti örneklerinde *E. faecalis*, hindi ve tavuk eti örneklerinde ise *E. durans* en sık görülen enterokok türü olarak saptanmıştır. Hindi eti *Enterococcus* pozitif izolatlarının % 5'i vankomisine

dirençli, % 5'i vankomisine orta düzeyde dirençli ve % 90'nı vankomisine duyarlı oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmada; hindi, tavuk ve organik tavuk eti *Enterococcus* spp. izolatlarının çoklu antibiyotik direnç profilleri (ampisilin, kloramfenikol, doksisiklin, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin, nitrofurantoin ve vankomisin) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Hindi eti izolatlarının % 3.33'ü 4 antibiyotiğe, % 6.67'si 3 antibiyotiğe, % 21.67'si 2 antibiyotiğe, % 23.33'ü bir antibiyotiğe birden dirençli oldukları saptanırken, % 45'i hiçbir antibiyotiğe dirençli olmadıkları bildirilmiştir (Miranda ve ark., 2007).

Washington DC'de yapılan başka bir çalışmada; toplam 43 tavuk eti ve 32 hindi eti incelenmiştir. Bu örneklerden elde edilen toplam 70 *Enterococcus* spp. izolatının 32'si *E. faecalis*, 33'ü *E. faecium*, 4'ü *E. gallinarum* ve 1'i *E. hirae* olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kinupristin/dalfopristine (≥ 4 µg/ml) dirençli izolatlarının 27'si *E. faecium*'a, 3'ü *E. gallinarum*'a, 1'i *E. hirae*'a ait olduğu saptanırken *E. faecalis* izolatlarının kinupristin/dalfopristine dirençli olmadıkları tespit edilmiştir. Toplam 27 kinupristin/dalfopristine dirençli *E. faecium* izolatının 23'ü tavuk eti ve 4'ü hindi eti örneklerine ait olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada; toplam 4 kinupristin/dalfopristine dirençli *E. gallinarum* izolatının 1'i tavuk et, 2'si hindi eti örneklerine ve kinupristin/dalfopristine dirençli *E. hirae* izolatı ise tavuk eti örneklerine ait olduğu saptanmıştır. Kinupristin/dalfopristine dirençli hindi *E. faecium* izolatlarının % 75'i eritromisine (8 µg/ml) ve penisiline (16 µg/ml), % 100'ü tetrasikline (16 µg/ml) dirençli oldukları saptanmıştır. Kinupristin/dalfopristine dirençli tavuk *E. faecium* izolatlarının % 13'ü eritromisine (8 µg/ml), % 69'u penisiline (16 µg/ml), % 75'i tetrasikline (16 µg/ml) dirençli oldukları tespit edilmiştir. Kinupristin/dalfopristine dirençli 2 hindi *E. gallinarum* izolatının 2'side eritromisin ve tetrasikline dirençli aynı zamanda penisiline duyarlı oldukları saptanmıştır. Kinupristin/dalfopristine dirençli tavuk *E. hirae* izolatı ise tetrasikline dirençli, eritromisin ve penisiline duyarlı olduğu bildirilmiştir (Simjee ve ark., 2002).

Kanada'nın Alberta eyaletinde yapılan bir başka çalışmada; toplam 564 hindi, tavuk, sığır ve domuz eti örneği incelenmiştir. Bu örneklerin 206'sı tavuk etine, 91'i hindi etine, 134'ü sığır etine, 133'ü domuz etine ait olduğu bildirilmiştir.

Hindi ve tavuk eti *Enterococcus* spp. izolatlarının % 94'ü, sığır eti izolatlarının % 73'ü ve domuz eti izolatlarının % 86'sı, *E. faecalis*'e ait olduğu saptanmıştır. Sığır eti izolatlarının % 21'i, domuz eti izolatlarının % 8'i, tavuk eti izolatlarının % 2'si *E. hirae* olduğu tespit edilmiştir. Sığır ve domuz eti izolatlarının % 2'si, tavuk eti izolatlarının % 4'ü *E. faecium*'a ait olduğu saptanmıştır. Hindi eti izolatlarında ise *E. faecium* ve *E. hirae* bulunmamıştır. Bu çalışmada; hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 5'i, tavuk ve domuz eti *E. faecalis* izolatlarının % 3'ü, sığır *E. hirae* izolatlarının % 4'ü tigesikline (≥ 1 µg/ml) dirençli oldukları saptanmıştır. Tavuk eti *E. faecium* izolatlarının % 78'i ve domuz eti *E. faecium* izolatlarının % 50'si, kinupristin/dalfopristine (≥ 4 µg/ml) dirençli oldukları tespit edilmiştir. Hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 28'i, tavuk eti *E. faecalis* izolatlarının % 47'si, sığır eti *E. faecalis* izolatlarının % 2'si, domuz eti *E. faecalis* izolatlarının % 8'i eritromisine (≥ 8 µg/ml) dirençli oldukları belirtilmiştir. Hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 29'u tilosine (≥ 32 µg/ml) ve % 15'i kanamisinine (≥ 1024 µg/ml), tavuk eti *E. faecalis* izolatlarının % 49'u tilosine ve % 20'si kanamisinine, tavuk eti *E. faecium* izolatlarının % 11'i kanamisinine dirençli oldukları saptanmıştır. Aynı çalışmada toplam 91 hindi eti *E. faecalis* izolatının, % 97'si kinupristin/dalfopristine (≥ 4 µg/ml), % 10'u gentamisinine (≥ 500 µg/ml), % 97'si linkomisinine (≥ 8 µg/ml), % 11'i streptomisinine (≥ 1000 µg/ml) ve % 90'ı tetrasikline (≥ 16 µg/ml) dirençli oldukları bildirilmiştir. Yine hindi eti *E. faecalis* izolatlarının % 91'i, tavuk eti *E. faecalis* izolatlarının % 91'i, sığır eti *E. faecalis* izolatlarının % 14'ü ve domuz eti *E. faecalis* izolatlarının % 45'i, üç ve üzeri antibiyotiğe birden dirençli oldukları bildirilmiştir (Aslam ve ark., 2012).

Türkiyede yapılan bir çalışmada; Ege bölgesinde hasta ve ölü balıklardan izole edilen 26 *E. faecalis* suşunun antibiyotik dirençlilikleri incelenmiştir. Bu çalışmada *E. faecalis* suşlarının siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisin duyarlılıkları agar-disk difüzyon tekniği ile ve vankomisin dirençli enterokokların (VRE) vankomisin direnç fenotipleri agar dilusyon yöntemi ile belirlenmiştir. İncelenen *E. faecalis* suşları, siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisine sırasıyla % 34.6, % 3.8, % 3.8, % 96.1, % 11.5, % 92.3, % 11.5 ve % 3.8 oranında dirençli oldukları belirlenmiştir. İncelenen 26 suştan

1'inin (% 3.8) vankomisine dirençli olduğu ve bu suşun vankomisin direnç fenotipinin *van A* olduğu saptanmıştır (Savaşan ve ark., 2008).

Türkiyede yapılan başka bir çalışmada; Ankara bölgesinde toplam 106 tavuk boyun deri örneğinin 83'ü (% 78) *Enterococcus* spp ile kontamine olduğu bildirilmiştir. Bu izolatların; % 48'i *E. faecium*, % 23'ü *E. durans*, % 19'u *E. faecalis*, % 6'sı *E. gallinarum*, % 1'i *E. hirae*, % 1 *E. mundtii* ve % 1 *E. casseliflavus* olduğu saptanmıştır. *E. faecalis* izolatlarının % 100'u ve *E. faecium* izolatlarının % 68'i streptomisine, *E. faecalis* izolatlarının % 31'i ve *E. faecium* izolatlarının % 21'i gentamisine dirençli oldukları belirlenmiştir. *E. faecium* izolatlarının dörtte biri (1/4), eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve streptomisine birden dirençli oldukları saptanmıştır. *E. faecalis* izolatlarının % 44'ü, eritromisin, tetrasiklin ve streptomisin birden dirençli oldukları bildirilmiştir. Multipleks PCR yöntemi ile izolatlarının hiçbiride *van A* veya *van B* geni bulunmamıştır ([Kasimoglu-Dogru](#) ve ark., 2010).

Bütün bu çalışmalardan elde edilen farklılıkların orijinden, coğrafik farklardan, çalışma periyodundan, örnekleme prosedürlerinden, örneklerin başlangıç kontaminasyonundan, kesimhane hijyeninden, ürünlerde oluşan çapraz kontaminasyondan ve metot farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada vankomisine direnç gösteren izolatların MİK değerlerinin belirlenmesi için yapılan E-test sonuçlarına göre *Enterococcus* spp. izolatlarından 3'ünün (% 6) MİK değerlerinin 256 µg/ml'nin üzerinde olduğu yani yüksek seviyede vankomisin direnci (MİK 64 – 128 µg/ml) gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 129 tavuk eti örneklerinden 23'ünün (% 17,82) vankomisine karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Bu örneklerden 7'si yüksek seviyede vankomisin direnci (MİK 64 – 128 µg/ml) göstermiştir (López ve ark., 2009).

Yüksek seviyede vankomisin direncinin *Enterococcus* spp. izolatlarından *S. aureus* izolatlarına *in vivo* ve *in vitro* ortamda aktarılabilirdiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Noble ve ark., 1992; Lowy, 2003). Çalışma sonuçları da dikkate alındığında, vankomisinin direncinin başta *S. aureus* olmak üzere diğer patojenlere

aktarılabilmesi ve insanlardan elde edilebilecek potansiyel izolatlar ile ilgili kapsamlı epidemiyolojik çalışmalara gereksinim duyulduğu sonucuna varılmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asgari teknik ve hijyenik şartlara sahip olmayan kesimlere bağılı olarak bağırsak içeriğı ile kontamine olan hayvansal gıdalar antibiyotik dirençli mikroorganizmalar için kaynak olmaktadır. Enterokoklar hemen hemen her yerde bulunmaları ve sıcaklık, pH, tuza karşı olan dirençleri sayesinde, gıda üretimi sırasında canlı kalarak üretimin her aşamasında kontaminasyona neden olabilmektedirler. Bu nedenlerle gıdalarda bulunmaları; uygun olmayan üretim koşulları ve kontaminasyon seviyesinin bir göstergesi (hijyen indikatörü) olarak bilinmektedir.

Vankomisine karşı direnç, gıda kaynaklı *Enterococcus* spp.'ler arasında en önemli direnç fenotipi olarak kabul edilmektedir. Vankomisin gibi glikopeptidlerin önemi, çoklu ilaç direnci gösteren türlere ya da penisilin, ampisilin gibi antibiyotiklere karşı alerji gösteren kişilerin klinik tedavisinde kullanılmalarından kaynaklanmaktadır. Bu antibiyotikler immun sistemi baskılanmış bireylerde bazı infeksiyonlara karşı en son çare olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Aynı zamanda direnç genlerinin gıda aracılığıyla insanlara taşınması bu durumu daha da ciddileştirmektedir. Bu nedenle VRE'ler halk sağığı açısından global bir tehdit olarak ortaya çıkmaktadır.

Gıda kaynaklı enterokok türleri, taşıyıcıya adapte olabilen genetik materyallerini değiştirebilmeleri ve genetik bilgilerini diğer türlerle paylaşabilmeleri nedeniyle, mevcut genomun değişmesine yol açmakta ya da plazmidler aracılığıyla genetik materyallerin hücreler arası transferine neden olabilmektedir. Bu durum gıdalarda bulunan *Enterococcus* spp.'lerin taşıdığı antibiyotik direnç genlerinin insanlara aktarılmasında oldukça önemlidir

Dünyada nozokomiyal infeksiyonlar açısından oldukça önemli bir konumda olan VRE'nin gıdalarda varlığı ile ilgili çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye'de ise *Enterococcus* spp.'nin hindi eti örneklerinde varlığı, antibiyotik direnç profilleri ve vankomisine karşı minimal inhibisyon konsantrasyonlarının

belirlendiği, örneklerde baskın olan *E faecalis* ve *E. faecium* türlerindeki vankomisin direnç genlerinin yaygınlığını araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle Türkiye’de hindi eti gibi riskli gıdalardaki durumunun belirlenecek olması, gıda güvenliği ve halk sağlığı boyutu ile ilgili bilimsel bir veri sağlanması çalışmaya orijinallik katmaktadır.

Bu çalışmada hindi kuşbaşı örneklerinde multipleks PCR ile etkenin tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır. CLSI standardında ifade edilen ve direnç profillerinin belirlenmesi zorunlu olan eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, penisilin, streptomisin, vankomisin, linezolid, kinupristin-dalfopristin olmak üzere toplam 8 antibiyotiğe karşı direnç profilleri belirlenmiştir. *Enterococcus* spp.’lerin multipleks PCR ile *van A* ve *van B* genleri belirlenmiştir. Vankomisin direnç gösteren tüm izolatlarda E test yöntemiyle vankomisin MİK değerleri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmada elde edilen bulgular incelendiğinde hindi kuşbaşı örneklerinin önemli düzeyde *Enterococcus* spp. ile kontamine oldukları, vankomisine ve diğ er antibiyotiklere karşı yüksek seviyedeki direnç profilleri gösterdikleri saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların ulusal Antimikrobiyal Direnç (AMR) izleme planı kapsamında büyük önem taşıdığı görüşüne varılmıştır. Gıdalarda bir diğ er temel sorun *van A* ve *van B* genine sahip izolatların insanlara tranfer edilmesi ve potansiyel akatarımıdır. Bu neden ile vankomisine dirençli enterokokların halk sağlığı açısından büyük önem taşıması nedeniyle çiftlikten sofraya gıda güvenliği kapsamında *Enterococcus* spp. ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların yapılması özellikle gıda kaynaklı vankomisin dirençli enterokok (VRE) infeksiyonlarında tedavide kullanılan antibiyotiklerin belirlenmesi açısından izlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

ÖZET

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

Bu kapsamda toplam 100 hindi kuşbaşı örnek analiz edilmiş, 50'si (% 50) *Enterococcus* spp. pozitif olarak tespit edilmiştir. Serotiplendirme sonuçlarına göre 50 örneğin 21'i (% 42) *E. faecalis*, 19'u (% 38) *E. faecium*, 5'i (% 10) *E. gallinarum*, 1'i (% 2) *E. durans*, 1'i (% 2) *E. hirae*, 3'ü (% 6) ise *E. casseliflavus* olarak identifiye edilmiştir. *Enterococcus* spp. olarak belirlenen 50 izolatın 7'sinin (% 14) *van A*, 18'inin (% 36) *van B* geni yönünden pozitif olduğu saptanmıştır. Antibiyotik direnç profillerine göre 50 izolatın 6'sının (% 12) 2 antibiyotiğe, 15'inin (% 30) 3 antibiyotiğe, 17'sinin (% 34) 4 antibiyotiğe, 8'inin (% 16) 5 antibiyotiğe, 3'ünün (% 6) 6 antibiyotiğe birden dirençli oldukları, bir *E. faecalis* (% 2) izolatı bir antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Vankomisin dirençli enterokok (VRE), multipleks PCR, antibiyotik direnç, *E. faecalis*, *E. faecium*, *van A*, *van B*

SUMMARY

The objectives of this study were to isolate and identify *Enterococcus* spp. from turkey retail meat samples collected from Ankara markets by classical culture method and using biochemical tests, to verify the isolates by PCR (Polymerase Chain Reaction), to evaluate the antibiotic resistance profiles of the verified *Enterococcus* spp. isolates with 8 different antibiotics including erythromycin, chloramphenicol, gentamicin, penicillin, streptomycin, vancomycin, linezolid, quinupristin-dalfopristin according to CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute) standards, to determine the molecular characterization of the serotypes identified as *E. faecalis* and *E. faecium* for *van A* and *van B* resistance phenotypes with multiplex PCR, to verify of positive isolates' species with multiplex PCR, to determine MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values of all the isolates determined as vancomycin resistant by E test.

For this purpose, 100 turkey retail meat samples were analyzed, fifty (% 50) of the samples were detected as *Enterococcus* spp. positive. According to serotyping results 21 (% 42) were isolated as *E. faecalis*, 19 (% 38) were isolated as *E. faecium*, 5 (% 10) were isolated as *E. gallinarum*, 1 (% 2) was isolated as *E. durans*, 1 was isolated as (% 2) *E. hirae*, 3 (% 6) were isolated as *E. casseliflavus*. Among 50 isolates confirmed as *Enterococcus* spp., 7 isolates (% 14) were detected as *van A* positive, 18 isolates (% 36) were detected as *van B* positive. According to antibiotic resistance profiles, 6 isolates (% 12) were resistant to 2, 15 isolates (% 30) were resistant to 3, 17 isolates (% 34) were resistant to 4, 8 isolates (% 16) were resistant to 5, 1 *E. faecalis* isolate (% 2) were resistant to one of the 8 antibiotics out of 50 isolates.

Keywords: Vancomycin resistant Enterococci (VRE), multiplex PCR, antibiotic resistance, *E. faecalis*, *E. faecium*, *van A*, *van B*

KAYNAKLAR

- AARESTRUP FM (1995). Occurrence of glycopeptides resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist.*, **1**: 255-257.
- AGERSØ Y, LESTER CH, PORSBO LJ, ØRSTED I, EMBORG HD, OLSEN KEP, JENSEN L B, HEUER OE, FRIMODT-MØLLER N, AARESTRUP FM, HAMMERUM AM (2008). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. *J Antimicrob Chemother.*, **62** (4): 844-845.
- AHMAD M, SMITH DG, MAHBOOB S (2002). Effect of heat treatment on stationary phase cells of *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *Int J Agri Biol.*, **4** (2): 234-236.
- ANDERSSON DI, HUGHES D (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.*, **8**: 260-271.
- ANON (2011a). CDC (Centers for Disease Control and Prevention). National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS), Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in healthcare settings. Erişim adresi: [http://www.cdc.gov/ncidod/hip/SURVEILL/NNIS.HTM]. Erişim Tarihi: 07.12.2015.
- ANON (2011b). Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 **31**(1): 84-87.
- ANON (2014). Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. January 2014.
- ANON (1998). Council Regulation No: 2821/98 of 17 December, 1998 amending, as regards withdrawal of the authorization of certain antibiotics. Directive 70/524/EEC concerning additives feedingstuffs. Erişim Adresi: [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31998R2821]. Erişim Tarihi: 10.10.2015
- ANON (2005). ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Erişim adresi: [http://www.ecdc.europa.eu/en/eaad/pages/toolkithospitalprescribers_keymessages.a.spx]. Erişim Tarihi: 14.12.2015.
- ANON (2002a). Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Tebliğ No: 2002/66 Yem Katkı Ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı Ve Kullanımı Hakkında Tebliğ, Yayımlandığı Resmi Gazete: 18.12.2002-24967. Erişim Adresi: [www.gkgm.gov.tr]. Erişim Tarihi: 10.10.2015
- ANON (2002 b). WHO (World Health Organization). Prevention of hospital-acquired infections. Eds.: G. Duce, F. Hygie, Geneva, J. S. Fabry, U. Claude-Bernard, Lyon, F. L. Nicolle, 2nd ed., Erişim adresi: [http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12/en/index.html]. Erişim Tarihi: 25.11.2015.

- ANON (2003). WHO/FAO/OIE (World Health Organization of the United Nations/Food and Agriculture Organization/ World Organisation for Animal Health). Background Document for the Joint WHO/FAO/OIE Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific Assessment, Geneva, Switzerland. Erişim adresi: [http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/]. Erişim Tarihi: 12.12.2015.
- ASLAM M, DIARRA MS, CHECKLEY S, BOHAYCHUK V, MASSON L (2012). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.*, **156** (3): 222-230.
- BARBOSA TM, LEVY SB (2000). The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, **3** (5): 303-311.
- BENNETT PM (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.*, **153** (Suppl 1): S347-S357.
- BENSING BA, DUNNY GM (1993). Cloning and molecular analysis of genes affecting expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregate formation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.*, **175** (22): 7421-7429.
- 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. *Appl Environ Microbiol.*, **73** (10): 3307-3319.
- BILSTRÖM H (2008). Molecular epidemiology of clinical *E. faecium*. Thesis. From the division of clinical microbiology, department of laboratory medicine. Carolinska Institutet, Stockholm, Sweden. p:1-61. Erişim adresi: [diss.kib.ki.se/2008/978-91...8/thesis.pdf].
- BLAIR JM, WEBBER MA, BAYLAY AJ, OGBOLU DO, PIDDOCK LJ (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.*, **13** (1): 42-51.
- BLÁZQUEZ J, OLIVER A, GÓMEZ-GÓMEZ JM. (2002). Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr Drug Targets.*, **3** (4): 345-349.
- BORGEN K, SORUM M, WASTESON Y, KRUSE H (2001). VanA type vancomycin resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int J Food Microbiol.*, **64** (1-2): 89-94.
- BOYD DA, DU T, HIZON R, KAPLEN B, MURPHY T, TYLER S, BROWN S, JAMIESON F, WEISS K, MULVEY MR (2006). VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother.*, **50** (6): 2217-2221.
- BURÍAN J, RAMÓN-GARCÍA S, SWEET G, GÓMEZ-VELASCO A, AV-GAY Y, THOMPSON CJ (2012). The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. *J Biol Chem.*, **287** (1): 299-310.

- CAMBRAY G, GUEROUT AM, MAZEL D (2010). Integrons. *Annu Rev Genet.*, **44**:141-166.
- CATTOIR V, LECLERCQ R (2013). Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J Antimicrob Chemother.*, **68** (4): 731-742.
- CETINKAYA Y, FALK P, MAYHALL CG (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.*, **13** (4): 686-707.
- CHENG S, MCCLESKEY FK, GRESS MJ, PETROZIELLO JM, LIU R, NAMDARI H, BENINGA K, SALMEN A, DELVECCHIO VG (1997). A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.*, **35**: 1248-1250.
- CHENOWETH C, SCHABERG D (1990). The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **9** (2): 80-89.
- CLEWELL DB (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, **73** (1): 9-12.
- COURVALIN P (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis.*, **42** (Suppl 1): S25-S34.
- 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** (1): 77-84.
- COX G, WRIGHT GD (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol.*, **303**(6-7): 287-92.
- DAVIES J, DAVIES D (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **74** (3): 417-433.
- DAY AM, COVE JH, PHILLIPS-JONES MK (2003). Cytolysin gene expression in *Enterococcus faecalis* is regulated in response to aerobiosis conditions. *Mol Genet Genomics.*, **269** (1): 31-39.
- DEMIRTURK N, DEMIRDAL T (2004). The Problem of the antimicrobial drug resistance. *Med J KOCATEPE*, **5** (2): 17-21.
- DEPARDIEU F, BONORA MG, REYNOLDS PE, COURVALIN P (2003). The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol Microbiol.*, **50** (3): 931-948.
- DOMIG KJ, MAYER HK, KNEIFE W (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol.*, **88** (2-3): 165-188.
- DUTKA MALEN S, EVERS S, COURVALIN P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.*, **33** (1): 24-27.
- EATON TJ, GASSON MJ (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.*, **67** (4): 1628-1635.
- EROL I (2007). *Enterococcus*. In: Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi, Ed.: I. Erol, Ankara: Pozitif Matbaacılık, p.: 166-168.

- EVERS S, SAHM DF, COURVALIN P (1993). The *vanB* gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins *vanA* and *vanC*. *Gene*, **124** (1): 143-144.
- FABRETTI F, THEILACKER C, BALDASSARRI L, ZBIGNIEW 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. *Infect Immun.*, **74** (7): 4164-4171.
- FACKLAM RR, COLLINS MD (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol.*, **27** (4): 731-734.
- FACKLAM RR, ELLIOTT JA (1995). Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clin Microbiol Rev.*, **8** (4): 479-495.
- FERNÁNDEZ L, HANCOCK RE (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev.*, **25** (4): 661-681.
- FISHER K, PHILLIPS C (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, **155** (6): 1749-1757.
- FOULQUIÉ MORENO MR, SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E, DE VUYST L (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol.*, **106** (1):1-24.
- FRANZ CMAP, HOLZAPFEL WH, STILES ME (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *Int J Food Microbiol.*, **47** (1-2): 1-24.
- FRANZ CMAP, STILES ME, SCHLEIFER KH, HOLZAPFEL WH (2003). *Enterococci* in foods-a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.*, **88** (2-3): 105-122.
- GARRIDO AM, GÁLVEZ A, PULIDO RP (2014). Antimicrobial Resistance in *Enterococci*. *J Infect Dis Ther.*, **2** (4): 1-7.
- GAZZOLA S, FONTANA C, BASSI D, COCCONCELLI PS (2012). Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and -independent methods. *Food Microbiol.*, **30** (2): 348-354.
- GELSOMINO R, VANCANNEYT M, COGAN TM, SWINGS J (2003). Effect of raw-milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. *Appl Environ Microbiol.*, **69** (1): 312-319.
- GIEDRAITIENĖ A, VITKAUSKIENĖ A, NAGINIENĖ R, PAVILONIS A (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, **47** (3): 137-46.
- GIRAFFA G (2002). *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiol Rev.*, **26** (2): 163-171.
- GOLD HS (2001). Vancomycin-Resistant *Enterococci*: Mechanisms and Clinical Observations. *Clin Infect Dis.*, **33** (2): 210-219.
- GÓMEZ-GIL R, ROMERO-GÓMEZ MP, GARCÍA-ARIAS A, UBEDA MG, BUSSELO MS, CISTERNA R, GUTIÉRREZ-ALTÉS A, MINGORANCE J (2009). Nosocomial

outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **65** (2): 175-179.

- GOUSIA P, ECONOMOU V, BOZIDIS P, PAPADOPOULOU C (2015). Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin. *Foodborne Pathog Dis.*, **12** (3): 214-220.
- GUERRERO-RAMOS E, MOLINA-GONZÁLEZ D, BLANCO-MORÁN S, IGREJAS G, POETA P, ALONSO-CALLEJA C, CAPITA R (2016). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Genotypic Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Meat Preparations. *J Food Prot.*, **79** (5): 748-756.
- GUZMÁN CA, PRUZZO C, PLATÉ M, GUARDATI MC, CALEGARI L (1991). Serum dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesins involved in the colonization of heart cells. *Microb Pathog.*, **11** (6): 399-409.
- HAAS W, SHEPARD BD, GILMORE MS (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature*, **415** (6867): 84-87.
- HÄLLGREN A, CLAEISSON C, SAEEDI B, MONSTEIN HJ, HANBERGER H, NILSSON L E (2009). Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol.*, **299** (5): 323-332.
- HANDWERGER S, PERLMAN DC, ALTARAC D, MCAULIFFE V (1992). Concomitant high level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci. *Clin Infect Dis.*, **14**: 655-661.
- HARTMAN PA, DEIBEL RH, SIEVERDING LM (1992). *Enterococci*. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, Ed.: C. Vanderzant, D. F. Splittstoesser, Washington, D. C.: American Public Health Association, Pp.: 523-531.
- HAYES JR, ENGLISH LL, CARTER PJ, PROESCHOLDT T, LEE KY, WAGNER DD, WHITE DG (2003). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. *Appl Environ Microbiol.*, **69** (12): 7153-7160.
- HERMAN DJ, GERDING DN (1991). Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.*, **35** (2): 215-219.
- HIDANO A, YAMAMOTO T, HAYAMA Y, MUROGA N, KOBAYASHI S, NISHIDA T, TSUTSUI T (2015). Unraveling Antimicrobial Resistance Genes and Phenotype Patterns among *Enterococcus faecalis* Isolated from Retail Chicken Products in Japan. *PLoS One*, **10** (3): 1-15.
- HOLLENBECK BL, RICE L B (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. *Virulence*, **3** (5): 421-433.
- HUANG MB, BAKER CN, BANERJEE S, TENOVER FC (1992). Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejuni*, and gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol.*, **30** (12): 3243-3248.

- HUDDLESTON JR (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist.*, **7**: 167-176.
- IVANOV IT, BOYTCHEVA S, MIHAILOVA G (1999). Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and preincubation temperature. *J Therm Biol.*, **24** (4): 217-227.
- JACKSON CR, FEDORKA CRAY PJ, BARRETT JB (2004). Use of genus and species specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol.*, **42** (8): 3558-3565.
- JACKSON CR, KARIYAWASAM S, BORST LB, FRYE JG, BARRETT JB, HIOTT LM, WOODLEY TA (2015). Antimicrobial resistance, virulence determinants and genetic profiles of clinical and nonclinical *Enterococcus cecorum* from poultry. *Lett Appl Microbiol.*, **60** (2): 111-119.
- JAHAN M, ZHANEL GG, SPARLING R, HOLLEY RA (2015). Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol.*, **199**: 78-85.
- JANKOSKA G, TRAJKOVSKA-DOKIC E, PANOVSKI N, POPOVSKA-JOVANOVSKA K, PETROVSKA M (2008). Virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* isolated from urine samples. *Prilozi*, **29** (1): 57-66.
- JETT BD, HUYCKE MM, GILMORE MS (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.*, **7** (4): 462-478.
- JUNG WK, LIM JY, KWON NH, KIM JM, HONG SK, KOO HC, KIM SH, PARK YH (2007). Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *Int J Food Microbiol.*, **113** (1): 102-107.
- KARIYAMA R, MITSUHATA R, CHOW JW, CLEWELL DB, KUMON H. (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.*, **38** (8): 3092-3095.
- KASIMOGLU DOGRU A, GENÇAY YE, AYAZ ND (2010). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Res Vet Sci.*, **89** (2): 153-158.
- KAYAOGU G, ØRSTAVIK D (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.*, **15** (5): 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. *J Clin Microbiol.*, **37** (11): 3497-3503.
- KLARE I, KONSTABEL C, BADSTÜBNER D, WERNER G, WITTE W (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.*, **88** (2-3): 269-290.
- KLARE I, BADSTÜBNER D, KONSTABEL C, BÖHME G, CLAUS H, WITTE W (1999). Decreased incidence of *VanA*-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after

- discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb Drug Resist.*, **5** (1): 45-52.
- KLEIN G (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol.*, **88** (2-3): 123-131.
- KLEIN G, PACK A, REUTER G (1998). Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol.*, **64** (5): 1825-1830.
- KOCH S, HUFNAGEL M, THEILACKER C, HUEBNER J (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, **22** (7): 822-830.
- KOLUMAN A, AKAN LS, CAKIROĞLU FP (2009). Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*, **20** (3): 281-283.
- KROČKO M, ČANIGOVÁ M, DUCKOVÁ V (2007). OCCURRENCE, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw pork, beef and poultry. *J Food Nutr Res.*, **46** (2): 91-95.
- KUMAR A, SCHWEIZER HP (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.*, **57** (10): 1486-1513.
- LECLERCQ R (1997). *Enterococci* acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis.*, **24** (Suppl 1): S80-S84.
- LEMCKE R, BULTE M (2000). Occurrence of the vancomycin-resistant genes Van A, Van B, Van C1, Van C2 and Van C3 in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int J Food Microbiol.*, **60** (2-3): 185-194.
- LI XZ, PLÉSIAT P, NIKAIDO H (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.*, **28** (2): 337-418.
- LÓPEZ M, SÁENZ Y, ROJO BEZARES B, MARTINEZ S, CAMPO R, RUIZ LARREA F, ZARAZAGA M, TORRES C (2009). Detection of *vanA* and *vanB2* containing *enterococci* from foodsamples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int J Food Microbiol.*, **133** (1-2): 172-178.
- LOW YL, JAKUBOVICS NS, FLATMAN JC, JENKINSON HF, SMITH AW (2003). Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol.*, **52** (Pt 2): 113-119.
- LOWE AM., LAMBERT PA, SMITH AW (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun.*, **63** (2): 703-706.
- LOWY FD (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.*, **111** (9): 1265-1273.
- MAJHENIČ AČ (2006). *Enterococci* yin-yang microbes. *Mljekarstvo*, **56** (1): 5-20.
- MANERO A, BLANCH AR (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.*, **65** (10): 4425-4430.

- MAROTHI YA, AGNIHOTRI H, DUBEY D (2005). Enterococcal resistance-an overview. *Indian J Med Microbiol.*, **23** (4): 214-219.
- MARTINEZ S, LÓPEZ M, BERNARDO A (2003). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett Appl Microbiol.*, **37** (6): 475-481.
- MAZAHARI NEZHAD FARD R, BARTON MD, HEUZENROEDER MW (2014). Detection of *vanC1* and *vanC2* Genes in an *Enterococcal* Isolate and *vanC* Genes in non-Motile *Enterococcus* spp. *Avicenna J Clin Microb Infec.*, **1** (3): 1-15.
- MEAWAD TE, EL NAKERA AM, EL MAGHRABY HM, EL SHARKAWY AA (2015). Detection of Integrins in Gram Positive and Non Fermentative Gram Negative Isolates from Intensive Care Unit of Zagazig University Hospitals. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, **24** (2): 11-17.
- MÉNDEZ-ÁLVAREZ S, PÉREZ-HERNÁNDEZ X, FÉLIX CLAVERIE-MARTIN F (2000). Glycopeptide resistance in *enterococci*. *Int Microbiol.*, **3** (2): 71-80.
- MESSI P, GUERRIERI E, DE NIEDERHÄUSERN S, SABIA C, BONDI M (2006). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int J FoodMicrobiol.*, **107** (2): 218-222.
- MCDONALD JR, OLAISON L, ANDERSON DJ, HOEN B, MIRO JM, EYKYN S, ABRUTYN E, FOWLER VG, HABIB G, SELTON-SUTY C, PAPPAS PA, CABELL CH, COREY GR, MARCO F, SEXTON DJ. (2005). Enterococcal endocarditis: 107 cases from the international collaboration on endocarditis merged database. *Am J Med.*, **118** (7): 759-766.
- MCGOWAN LL, JACKSON CR, BARRETT JB, HIOTT LM, FEDORKA-CRAY PJ (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of *enterococci* isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J Food Prot.*, **69** (12): 2976-2982.
- MCKESSAR SJ, BERRY AM, BELL JM, TURNIDGE JD, PATON JC (2000). Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **44** (11): 3224-3228.
- MILLER WR, MUNITA JM, ARIAS CA (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, **12** (10): 1221-1236.
- MIRANDA JM, GUARDDON M, MONDRAGON A, VÁZQUEZ BI, FENTE CA, CEPEDA A, FRANCO, C. M. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *J Food Prot.*, **70** (4):1021-1024.
- MIRZAEI B, BABAEI R, ASIABAR AP, BAMERI Z (2015). Detection of both *vanA* & *vanB* genes in *vanA* phenotypes of *Enterococci* by Taq Man RT-PCR. *Braz J Microbiol.*, **46** (1): 161-165.
- MOHAMED JA, HUANG DB (2007). Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.*, **56** (12): 1581-1588.
- MONTECALVO MA, HOROWITZ H, GEDRIS C, CARBONARO C, TENOVER FC, ISSAH A, COOK P, WORMSER GP (1994). Outbreak of vancomycin-, ampicillin-,

- and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrob Agents Chemother.*, **38** (6): 1363-1367.
- MORIĆ I, SAVIĆ M, ILIĆ-TOMIĆ T, VOJNOVIĆ S, BAJKIĆ S, VASILJEVIĆ B (2010). rRNA Methyltransferases and their Role in Resistance to Antibiotics. *J Med Biochem.*, **29** (3): 165-174.
- MOSES V, JEROBIN J, NAIR A, SATHYENDARA S, BALAJI V, GEORGE IA, PETER JV (2012). Enterococcal bacteremia is associated with prolonged stay in the medical intensive care unit. *J Glob Infect Dis.*, **4** (1): 26-30.
- MUNDY LM, SAHM DF, GILMORE M (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.*, **13** (4): 513-522.
- MURRAY BE (1992). Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.*, **36** (11): 2355-2359.
- MURRAY BE (1998). Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.*, **4** (1): 37-47.
- MURRAY BE (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.*, **3** (1): 46-65.
- NALLAPAREDDY SR, WEINSTOCK GM, MURRAY BE (2003). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol.*, **47** (6): 1733-1747.
- NECIDOVÁ L, JANŠTOVÁ B, KARPÍŠKOVÁ S, CUPÁKOVÁ Š., DUŠKOVÁ M, KARPÍŠKOVÁ R (2009). Importance of *Enterococcus* spp. for Forming a Biofilm. *Czech J Food Sci.*, **27** (2): S354-S356.
- NOBLE WC, VIRANI Z, CREE R GA (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.*, **93** (2): 193-198.
- NOLLET L (2005). EU close to a future without antibiotic growth promoters. *World Poultry*, **21** (6): 14-15.
- OANCEA C, KLARE I, WITTE W, WERNER G (2004). Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.*, **54** (1): 232-235.
- OLAWALE AK, SALAKO RJ, OLAWALE AO, FAMUREWA O (2015). Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Food Canteens in Osun States, Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, **6** (4): 196-206.
- PAVIA M, NOBILE CG, SALPIETRO L, ANGELILLO IF (2000). Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J Food Prot.*, **63** (7): 912-915.
- PEREZ HERNANDEZ X, MENDEZ ALVAREZ S, CLAVERIE MARTIN FA (2002). PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **42** (4): 273-277.

- PESAVENTO G, CALONICO C, DUCCI B, MAGNANINI A, LO NOSTRO A (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiol*, **41**: 1-7.
- PETERS J, MAC K, WICHMANN SCHAUER H, KLEIN G, ELLERBROEK L (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol.*, **88** (2-3): 311-331.
- PETSARIS O, MISZCZAK F, GICQUEL BRUNEAU M, PERRIN GUYOMARD A, HUMBERT F, SANDERS P, LECLERCQ R (2005). Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens. *Appl Environ Microbiol.*, **71** (5): 2796- 2799.
- PHILIPS I, CASEWELL M, COX T, GROOT B, FRIIS C, JONES R, NIGHTINGALE C, PRESTON R, WADDELL J (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.*, **53**: 28-52.
- PORTILLO A, RUIZ-LARREA F, ZARAZAGA M, ALONSO A, MARTINEZ JL, TORRES C (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.*, **44** (4): 967-971.
- PSONI L, TZANETAKIS N, LITOPOULOU TZANETAKI E (2003). Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greekcheese from raw goat's milk. *Food Microbiol.*, **20**: 575-582.
- RAMIREZ MS, NIKOLAIDIS N, TOLMASKY ME (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac (6')-Ib paradigm. *Front Microbiol.*, **4** (121): 1-13.
- RAMIREZ MS, TOLMASKY ME (2010). Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat.*, **13** (6): 151-171.
- ROBREDO B, SINGH KV, BAQUERO F, MURRAY BE, TORRES C (2000). Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int J Food Microbiol.*, **54** (3): 197-204.
- RODRIGUEZ-ROJAS A, RODRIGUEZ-BELTRÁN J, COUCE A, BLÁZQUEZ J (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int J Med Microbiol.*, **303** (6-7): 293-297.
- ROWE-MAGNUS DA, MAZEL D (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int J Med Microbiol.*, **292** (2): 115-125.
- ROZDZINSKI E, MARRE R, SUSAN M, WIRTH R, MUSCHOLL-SILBERHORN A (2001). Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog.*, **30** (4): 211-220.
- SANNOMIYA P, CRAIG RA, CLEWELL DB, SUZUKI A, FUJINO M, TILL GO, MARASCO WA (1990). Characterization of a class of nonformylated *Enterococcus faecalis*-derived neutrophil chemotactic peptides: the sex pheromones. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **87** (1): 66-70.
- SAVAŞAN S, KAYA O, KIRKAN Ş, ÇİFTÇİ A (2008). Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **55** (2): 107-110.

- SHAIKH S, FATIMA J, SHAKIL S, RIZVI SM, KAMAL MA (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.*, **22** (1): 90-101.
- SHANTALA GB, NAGARATHNAMMA T (2015). Antibiotic Resistance In *Enterococci*: A Review. *Int J Pharm Bio Sci.*, **6** (4): 903-917.
- SHI X, ZHU X (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol.*, **20** (9): 407-413.
- SHANKAR N, COBURN P, PILLAR C, HAAS W, GILMORE M (2004). Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol.*, **293** (7-8): 609-618.
- SILLANPÄÄ J, PRAKASH VP, NALLAPAREDDY SR, MURRAY BE (2009). Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.*, **47** (4): 896-901.
- SILVER LL (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev.*, **24** (1): 71-109.
- SIMJEE S, WHITE DG, MENG J, WAGNER DD, QAIYUMI S, ZHAO S, HAYES JR, MCDERMOTT PF (2002). Prevalence of streptogramin resistance genes among *Enterococcus* isolates recovered from retail meats in the Greater Washington DC area. *J Antimicrob Chemother.*, **50** (6): 877-882.
- SOOD S, MALHOTRA M, DAS BK, KAPIL A (2008). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res.*, **128** (2): 111-121.
- SUJATHA S, PRAHARAJ I (2012). Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, **2012**: 1-10.
- SÜßMUTH SD, MUSCHOLL-SILBERHORN A, WIRTH R, SUSAN M, MARRE R, RODZINSKI E (2000). Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun.*, **68** (9): 4900-4906.
- SZEMES T, VLKOVA B, MINARIK G, TOTHOVA L, DRAHOVSKA H, TURNA J, CELEC P (2010). On the origin of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms in *Enterococcus faecalis*. *Redox Rep.*, **15** (5): 202-206.
- TALEBI M, SADEGHI J, RAHIMI F, POURSHAFIE MR (2015). Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* From Meat, Chicken and Cheese. *Jundishapur J Microbiol.*, **8** (4): e15815.
- TARCHINI G (2010). Empirical enterococcal coverage for complicated intra-abdominal infection. *Clin Infect Dis.*, **51** (6): 757-758.
- TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, GILMORE MS, SHANKAR N (2004). Enterococcal surface protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.*, **72** (10): 6032-6039.
- TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, SHANKAR N (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci.*, **60** (12): 2622-2636.

- TENDOLKAR PM, BAGHDAYAN AS, SHANKAR N (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.*, **188** (6): 2063-2072.
- TENOVER FC (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.*, **119** (6 Suppl 1): S3-S10.
- TOLEDO-ARANA A, VALLE J, SOLANO C, ARRIZUBIETA MJ, CUCARELLA C, LAMATA M, AMORENA B, LEIVA J, PENADÉS JR, LASA I (2001). The enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.*, **67** (10): 4538-4545.
- TRIVEDI K, CUPAKOVA S, KARPISKOVA R (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, **56** (7): 352-357.
- UPADHYAYA GPM., RAVIKUMAR KL, UMAPATHY BL (2009). Review of virulence factors of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol.*, **27** (4): 301-305.
- VAN DEN BOGAARD AE, STOBBERINGH EE (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.*, **14** (4): 327-335.
- VAN HOEK AH, MEVIUS D, GUERRA B, MULLANY P, ROBERTS AP, AARTS HJ (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.*, **28** (2): 203.
- VANKERCKHOVEN V, AUTGAERDEN TV, VAEL C, LAMMENS C, CHAPELLE S, ROSSI R, JABES D, GOOSSENS H (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.*, **42** (10): 4473-4479.
- VANKERCKHOVEN V, HUYS G, VANCANNEYT M, SNAUWAERT C, SWINGS J, KLARE I, WITTE W, VAN AUTGAERDEN T, CHAPELLE S, LAMMENS C, GOOSSENS H (2008). Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol.*, **74** (14): 4247-4255.
- VERGIS EN, SHANKAR N, CHOW JW, HAYDEN MK, SNYDMAN DR, ZERVOS MJ, LINDEN PK, WAGENER MM, MUDER RR (2002). Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis.*, **35** (5): 570-575.
- VERRAES C, VAN BOXSTAEL S, VAN MEERVENNE E, VAN COILLIE E, BUTAYE P, CATRY B, DE SCHAEZTEN MA, VAN HUFFEL X, IMBERECHTS H, DIERICK K, DAUBE G, SAEGERMAN C, DE BLOCK J, DEWULF J, HERMAN L (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health.*, **10** (7): 2643-2669.
- WEGENER HC, MADSEN M, NIELSEN N, AARESTRUP FM (1997). Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from food. *Int J Food Microbiol.*, **35**: 57-66.

- WERNER G, COQUE TM, HAMMERUM AM, HOPE R, HRYNIEWICZ W, JOHNSON A, KLARE I, KRISTINSON KG, LECLERCQ R, LESTER CH, LILLIE M, NOVAIS C, OLSON LILJEQUIST B, PEIXE LV, SADOVY E, SIMONSEN GS, TOP J, VUOPIO VARKILA J, WILLEMS RJ, WITTE W, WOODFORD N (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, **13**: 1-11.
- XU Y, SINGH KV, QIN X, MURRAY BE, WEINSTOCK GM (2000). Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun.*, **68** (2): 815-823.
- YURDAKUL NE, ERGINKAYA Z, ÜNAL E (2013). Antibiotic resistance of enterococci, coagulase negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat. *Czech J Food Sci.*, **31** (1): 14-19.
- ZEANA C, KUBIN CJ, DELLA LATTA P, HAMMER SM (2001). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis successfully managed with linezolid: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.*, **33** (4): 477-482.
- ZIRAKZADEH A, PATEL R. (2006). Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc.*, **81**(4): 529-536.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	Azam
Soyad	AZIMI MAHALLEH
Uğruğu	İRAN
Medeni Durum	Bekar
İletişim Adresi	Fatih caddesi- Ankara üniversitesi öğrenci evi-ANKARA
Telefon	05313055611

II- Eğitim Durumu

İlkokul	İran- Urmia- Farzanegan
Ortaokul	İran- Urmia- Farzanegan
Lise	İran- Urmia- Farzanegan
Üniversite	İran- Urmia Üniversitesi- Veteriner Fakültesi
Doktora	Ankara Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Veteriner Fakültesi- Gıda Hijyeni ve Teknolojisi ABD
Yabancı Dil	İngilizce- Türkçe

III- Bilimsel İlgi Alanlar

Ulusal Makaleler:

1. AZIMI MAHALLEH, A., GÖNCÜOĞLU, M. (2014). Enterokokların önemli virülens faktörleri ve gıdalarda bulunuşu. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.*, **25** (2): 47-52.

Uluslararası bildiri:

1. AZIMI MAHALLEH, A., GÖNCÜOĞLU, M. (2015). Hindi Kuşbaşı Örneklerinde Vankomisin Dirençli Enterokoklar ve Antibiyotik Direnç Profilleri. 3. Uluslararası Beyaz Et Kongresi, 22-26 Nisan, Antalya.

IV- Bilimsel Etkinlikleri

Seminerleri:

1. Yeni ve Yeniden Önem Kazanan Zoonoz ve Gıda Kaynaklı Hastalıklar (2012)
2. Enterekokların Önemli Virülens Faktörleri (2013)

