

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİD  
DİRENÇLİ *ENTEROCOCCUS* SPP. YAYGINLIĞI VE AMİNOGLİKOZİD-  
MODİFİYE EDİCİ ENZİM (AME) GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Rahime ÖZDEMİR**

**Danışman  
Prof. Dr. Yasin TUNCER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2018**



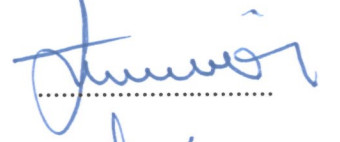
© 2018 [Rahime ÖZDEMİR]

## TEZ ONAYI

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

**Danışman**

**Prof. Dr. Yasin TUNCER**  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Seval Sevgi KIRDAR**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Hakan KULEAŞAN**  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Enstitü Müdürü**

**Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR** .....

## TAAHHÜTNAME

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

Rahime ÖZDEMİR



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	5
2.1. Enterokokların Genel Özellikleri .....	5
2.1.1. Tarihçe .....	5
2.1.2. Morfoloji, üreme ve biyokimyasal özellikleri .....	6
2.2. Enterokokların Gıdalarla İlişkisi .....	8
2.2.1. Enterokokların süt ve süt ürünleri ile ilişkisi .....	8
2.3. Antibiyotik Direnç .....	10
2.3.1. Antibiyotiklerin sınıflandırılması .....	13
2.3.1.1. Beta-laktamlara direnç .....	16
2.3.1.2. Glikopeptidlere direnç.....	17
2.3.1.3. Makrolid ve linkozamidlere direnç .....	17
2.3.1.4. Tetrasikline direnç.....	19
2.3.1.5. Rifampine direnç .....	19
2.3.1.6. Oksazolidinonlara direnç .....	20
2.3.1.7. Kinolonlara direnç.....	20
2.3.1.8. Kloramfenikole direnç .....	22
2.3.1.9. Aminoglikozidlere direnç.....	22
2.3.2. Aminoglikozid direnç mekanizmaları .....	24
2.3.2.1. Bakteri membran geçirgenliğindeki azalmaya bağlı oluşan direnç ...	25
2.3.2.2. Ribozomal hedef değişiklikleri .....	25
2.3.2.3. Enzimatik inaktivasyon .....	25
2.3.2.3.1. Aminoglikozid N-asetiltransferazlar (AAC'ler) .....	28
2.3.2.3.1.1. AAC(1) .....	29
2.3.2.3.1.2. AAC(3) .....	29
2.3.2.3.1.3. AAC(2').....	30
2.3.2.3.1.4. AAC(6').....	30
2.3.2.3.2. Aminoglikozid O-nükleotidiltransferazlar (ANT) .....	31
2.3.2.3.2.1. ANT(6).....	32
2.3.2.3.2.2. ANT (9).....	33
2.3.2.3.2.3. ANT(4').....	33
2.3.2.3.2.4. ANT(2'') .....	33
2.3.2.3.2.5. ANT(3'') .....	33
2.3.2.3.3. Aminoglikozid-O-fosfotransferazlar (APH) .....	34
2.3.2.3.3.1. APH(4).....	34
2.3.2.3.3.2. APH(6).....	34
2.3.2.3.3.3. APH(9).....	35
2.3.2.3.3.4. APH(3') .....	35
2.3.2.3.3.5. APH(2'') .....	36
2.3.2.3.3.6. APH(3'') .....	37

2.3.2.3.3.7. APH(7") .....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	38
3.1. Materyal.....	38
3.1.1. Süt ve süt ürünleri .....	38
3.1.2. Mikroorganizmalar .....	38
3.2. Yöntem .....	38
3.2.1. Yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel <i>Enterococcus</i> suşlarının izolasyonu .....	38
3.2.2. YSAD izolatların cins düzeyinde tanısı.....	39
3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi .....	39
3.2.2.2. MRS broth ortamında gelişme .....	39
3.2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile cins düzeyinde tanı .....	40
3.2.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu .....	40
3.2.2.3.2. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi .....	41
3.2.2.3.3. İzolatların cins özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı .....	42
3.2.3. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının tür düzeyinde tanısı.....	43
3.2.3.1. Türe özgü primerler ile tür düzeyinde tanı.....	43
3.2.3.2. Türe özgü primerler ile tanısı yapılamayan <i>Enterococcus</i> izolatlarının 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı.....	44
3.2.4. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi .....	45
3.2.5. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmesi.....	46
3.2.6. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) genlerinin varlığının PZR ile araştırılması.....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	50
4.1. Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) Muhtemel <i>Enterococcus</i> Suşlarının İzolasyonu ve Cins Düzeyinde Tanısı .....	50
4.2. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının Tür Düzeyinde Tanısı .....	55
4.3. YSAD <i>Enterococcus</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilleri .....	60
4.4. YSAD <i>Enterococcus</i> İzolatlarının Gentamisin ve Streptomisin Antibiyotiklerine Karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) .....	71
4.5. İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Araştırılması .....	74
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	85
6. KAYNAKLAR .....	88
ÖZGEÇMİŞ .....	105

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİNDE YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİD DİRENÇLİ *ENTEROCOCCUS* SPP. YAYGINLIĞI VE AMİNOGLİKOZİD-MODİFİYE EDİCİ ENZİM (AME) GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Rahime ÖZDEMİR

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yasin TUNCER

Bu çalışmanın amacı Isparta ve Antalya illerinde geleneksel ürün satılan market ve pazarlardan temin edilen toplam 100 çiğ süt (10) ve süt ürünü (70 peynir, 10 tereyağ, 10 yoğurt) yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) *Enterococcus* yaygınlığı ve aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) genleri varlığının araştırılmasıdır. Ayrıca, izolatların antibiyotik direnç profilleri ile gentamisin ve streptomisin minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) da belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında 24 örnekten (2 çiğ süt, 22 peynir) toplam 59 YSAD *Enterococcus* suşu izole edilmiştir. 59 YSAD izolatının 20'si yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) ve 39'u yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD) dir. Moleküler yöntemler ile (türe özgü PZR ve 16S rDNA dizi analizi) izolatların 26'sı *E. faecalis* (% 44.07), 18'i *E. faecium* (% 30.51), 13'ü *E. durans* (% 22.03) ve 2'si *E. gallinarum* (% 3.39) olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon testi sonucu YSAD *Enterococcus* izolatlarının en duyarlı olduğu antibiyotik olan teikoplanin, en dirençli oldukları antibiyotik ise tetrasiklin olduğu saptanmıştır. İzolatlar arasında antibiyotiklere en dirençli türün *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların % 89.83'ü (53/59) çoklu antibiyotik direncine (en az üç antibiyotiğe karşı dirençli) sahip bulunmuştur. YSAD *Enterococcus* izolatlarının streptomisin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı MİK değerlerinin 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. 59 YSAD *Enterococcus* izolatının 47'sinin (% 79.66) hem YSSD hem de YSGD oldukları tespit edilmiştir. YSAD *Enterococcus* izolatlarında en sık rastlanan aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) geninin % 94.92 (56/59) ile *aph(3')-IIIa* olduğu tespit edilmiştir. Bu geni sırasıyla % 45.76 (27/59) ile *ant(6')-Ia*, % 20.34 (12/59) ile *aph(2'')-Ic* ve % 10.17 (6/59) ile *ant(4')-Ia*'nın izlediği belirlenmiştir. İzolatlarının hiçbirinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib* ve *aph(2'')-Id* genlerine rastlanılmamıştır. PCR denemeleri sonucu *E. durans* RG20.1, *E. faecalis* RG22.4 ve RG26.1 izolatlarında AME geni varlığı tespit edilmemiştir. Sonuç olarak bu çalışma, çiğ süt ve peynir örneklerinde YSAD *Enterococcus* varlığını göstermiştir. YSAD *Enterococcus* izolatları yüksek seviyede aminoglikozid direnci ile ilişkili genlerin yayılmasında rezervuar görevi görebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Çiğ süt, peynir, *Enterococcus*, yüksek seviyede aminoglikozid direnci, gentamisin, streptomisin, aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) genleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

2018, 105 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### PREVALENCE OF HIGH LEVEL AMINOGLYCOSIDE RESISTANT (HLAR) *ENTEROCOCCUS* SPP. IN MILK AND DAIRY PRODUCTS AND DETECTION OF THEIR AMINOGLYCOSIDE-MODIFYING ENZYME (AME) GENES

Rahime ÖZDEMİR

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

Supervisor: Prof. Dr. Yasin TUNCER

The aim of this study is to investigate the prevalence of high-level aminoglycoside resistant (HLAR) *Enterococcus* in 100 raw milk (10) and dairy products (70 cheese, 10 butter, 10 yoghurt) obtained from traditional markets and bazaars in Isparta and Antalya; and to investigate the presence of aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes. In addition, the antibiotic resistance profiles of the isolates and gentamicin and streptomycin minimum inhibition concentrations (MIC) were also determined. Within the scope of thesis study, a total of 59 HLAR *Enterococcus* strains were isolated from 24 samples (2 raw milks, 22 cheeses). 20 of 59 HLAR isolates are high level of gentamicin resistant (HLGR) and the rest 39 is high level streptomycin resistance (HLSR). Of the isolates with molecular methods (species-specific PCR and 16S rDNA sequence analysis), 26 were defined as *E. faecalis* (44.07%), 18 as *E. faecium* (30.51%), 13 as *E. durans* (22.03%) and 2 were defined as *E. gallinarum* (3.39%). As a result of disc diffusion test, teicoplanin is the antibiotic to which HLAR *Enterococcus* isolates are the most sensitive; and tetracycline was the most resistant antibiotic. Among the isolates, *E. faecium* was found to be the most resistant species to antibiotics. 89.83% (53/59) of the isolates had multiple antibiotic resistance (resistant to at least three antibiotics). MIC value of HLAR *Enterococcus* isolates against streptomycin and gentamicin antibiotics ranged from 64 to >4096 µg/mL. It was determined that 47 (79.66%) of 59 HLAR *Enterococcus* isolates were both HLSR and HLGR. The most common aminoglycoside-modifying enzyme (AME) gene in *Enterococcus* isolates was *aph(3')-IIIa* with 94.92% (56/59). This gene was followed by *ant(6')-Ia*, 20.34% (12/59) with *aph(2'')-Ic* and 10.17% (6/59) and *ant(4')-Ia* with 45.76% (27/59), respectively. None of the isolates contained the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib* and *aph(2'')-Id* genes. As a result of PCR experiments, the presence of AME gene in *E. durans* RG20.1, *E. faecalis* RG22.4 and RG26.1 isolates was not detected. In conclusion, this study showed the presence of HLAR *Enterococcus* in raw milk and cheese samples. HLAR *Enterococcus* isolates can act as reservoirs in the dissemination of genes associated with high levels of aminoglycoside resistance.

**Keywords:** Raw milk, cheese, *Enterococcus*, high level aminoglycoside resistance, gentamicin, streptomycin, aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes, polymerase chain reaction (PCR)

2018, 105 pages



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, bilimsel çalışma disiplini öğrenmemde ve akademik gelişimimde büyük emeği olan yardım ve desteğini her zaman hissettiğim değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Yasin TUNCER'e,

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Banu ÖZDEN TUNCER'e,

Laboratuvar günlerini birlikte geçirdiğim arkadaşlarım Dr. Didem AKPINAR KANKAYA'ya, Dr. Duygu ALP'e ve Meltem YALÇIN' a,

Sonsuz sabırları ile her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen aileme ve nişanlım Bilal YORGA'ya,

Tezimi maddi olarak 4739-YL1-16 no'lu proje ile destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rahime ÖZDEMİR  
ISPARTA, 2018

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.1. RS25.1 nolu izolatin mikroskopik morfolojisi .....	53
Şekil 4.2. YSAD Muhtemel <i>Enterococcus</i> İzolatlarının genomik DNA örnekleri....	54
Şekil 4.3. YSAD İzolatların <i>Enterococcus</i> cinsine özgü primerler ile çoğaltılan PZR fragmentleri.....	55
Şekil 4.4. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının <i>E. faecalis</i> 'e özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı.....	56
Şekil 4.5. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının <i>E. faecium</i> 'a özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı.....	57
Şekil 4.6. <i>aph(3')-IIIa</i> genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	78
Şekil 4.7. <i>aph(3')-IIIa</i> genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	79

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1. Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etki şekilleri ve direnç mekanizmaları .....	15
Çizelge 2. 2. Aminoglikozid-modifiye edici enzimleri kodlayan enterokoklarda bugüne kadar tespit edilen direnç genleri.....	27
Çizelge 2. 3. Yüksek seviyede aminoglikozid direncinin gelişmesine neden olan mekanizmalar .....	28
Çizelge 3. 1. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan pcr karışımı.....	42
Çizelge 3. 2. <i>Enterococcus</i> izolatlarının tür düzeyinde tanısında kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri .....	43
Çizelge 3. 3. <i>Enterococcus</i> suşlarında ame genlerinin belirlenmesinde kullanılan primer dizileri.....	49
Çizelge 4.1. YSAD muhtemel <i>Enterococcus</i> suşlarının izolasyon kaynakları, örneklerin temin edildiği iller ve izolat kodları.....	51
Çizelge 4.2. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının tür düzeyinde tanısı .....	58
Çizelge 4.3. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSGD*/YSSD** <i>Enterococcus</i> türlerinin dağılımı .....	59
Çizelge 4.4. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının antibiyotik disk difüzyon test sonuçları .....	61
Çizelge 4.5. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri .....	64
Çizelge 4.6. YSAD <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> ve <i>E. gallinarum</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri .....	66
Çizelge 4.7. Çoklu antibiyotik direnç özelliği gösteren izolatların dirençli olduğu antibiyotikler, dirençli izolat sayısı ve yüzdeleri (%) .....	68
Çizelge 4.8. YSAD <i>Enterococcus</i> izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı MİK değerleri.....	72
Çizelge 4.9. YSAD <i>Enterococcus</i> suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili .....	75
Çizelge 4.10. YSSD <i>Enterococcus</i> izolatlarının AME genotip yüzdeleri (%) .....	81
Çizelge 4.11. YSGD <i>Enterococcus</i> izolatlarının AME genotip yüzdeleri (%).....	82
Çizelge 4.12. YSAD <i>Enterococcus</i> türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları.....	84
Çizelge 4.13. YSSD <i>Enterococcus</i> türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları.....	84
Çizelge 4.14. YSGD <i>Enterococcus</i> türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları.....	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAC Asetiltransferaz  
AME Aminoglikozid-modifiye edici enzim  
ANT Nükleotidiltransferaz  
APH Fosfotransferazlar  
ARE Antibiyotiğe dirençli enterokok  
ATP Adenozin trifosfat  
bç Baz çifti  
BHI Brain Heart Infusion broth  
CLSI Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü  
DNA Deoksiribo nükleik asit  
EDTA Etilen diamin tetra asetik asit  
EUCAST Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi  
FTS Fizyolojik tuzlu su  
G+S Guanin+sitozin  
GRE Glikopeptidlere karşı dirençli enterokoklar  
kob Koloni oluşturan birim  
L Litre  
LAB Laktik asit bakterileri  
LAP Lösinaminopeptidaz  
MİK Minimum inhibisyon konsantrasyonu  
mL Mililitre  
MLS Makrolid, Linkozamid, Streptogramin grubu  
MRS de Man Rogosa Sharpe  
NaCl Sodyum klorür  
NCBI National Center for Biotechnology Information  
NMR Nükleer manyetik rezonans  
RAPD-PCR Rastgele arttırılmış polimorfik DNA  
PFGE Darbeli alan jel elektroforezi  
rpm Dakikadaki devir sayısı  
PBP Penisilin bağlayıcı protein  
PBS Fosfat tampon  
PYR L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamidi  
PZR Polimeraz zincir reaksiyonu  
RpoB RNA polimeraz beta alt ünitesi  
rRNA Ribozomal ribonükleik asit  
SDS Sodyum dodesil sülfat  
VRE Vankomisin dirençli enterokok  
YSAD Yüksek seviyede aminoglikozid dirençli  
YSGD Yüksek seviyede gentamisin dirençli  
YSSD Yüksek seviyede streptomisin dirençli  
 $\alpha$  Alfa  
 $\beta$  Beta  
 $\gamma$  Gama  
 $\mu$ g Mikrogram

## 1. GİRİŞ

Enterokoklar gıda mikrobiyolojisi ve klinik mikrobiyoloji açısından önemli laktik asit bakterileri (LAB)'dir (Franz vd., 2003; Klein, 2003). Enterokoklar toprakta, suda ve atık sularda, bitkilerde, hayvanların (memeliler, kuşlar, sürüngenler, böcekler) ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında yer alırlar (Lukaskova ve Sustackova, 2003; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010). Bu kaynakların dışında deniz ürünlerinde, süt ürünleri gibi hayvansal kaynaklı gıdalarda, sebzelerde ve fermente gıdalarda bu mikroorganizmalara rastlanmaktadır (Hayes vd., 2003; Kühn vd., 2003).

Enterokokların hem pastörizasyon sıcaklıklarına dayanıklı olmaları hemde farklı substrat ve gelişme koşullarına (düşük ve yüksek sıcaklık, ekstrem pH ve tuz konsantrasyonları gibi gelişme koşullarına) kolay uyum sağlayabilmelerinden dolayı süt ve et gibi çiğ hammaddelerden üretilen hayvansal gıdalardan, özellikle fermente sosisler ve peynirlerden sıklıkla izole edilirler (Callewaert vd., 2000; Cariolato vd., 2008; Özden Tuncer vd., 2013; Yoğurtçu ve Tuncer, 2013, Tuncer vd., 2014). Bu bakteriler birçok gıdada doğal olarak bulunan ve çeşitli gıdaların fermantasyonunda rol oynayan önemli mikroorganizmalardır (Cocconcelli vd., 2003; Guessas ve Kihal, 2004). Akdeniz ülkelerindeki geleneksel peynirlerin mikrobiyotası üzerinde yapılan çalışmalar, enterokokların proteoliz, lipoliz ve sitrat yıkımı yoluyla bu peynirlerin olgunlaşmasında önemli role sahip olduğunu ve bunların tipik tat ve aromasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (Coppola vd., 1990; Giraffa vd., 1997; Franz vd., 1999). Özellikle bazı fermente et ürünlerinin ve bazı peynir çeşitlerinin mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluştururlar (Franz vd., 2003; Giraffa, 2003). *Enterococcus* türleri, et ve et ürünlerinde sıcaklık, pH ve tuza karşı dirençli olmaları nedeniyle sayıları yüksek düzeylere çıkabilmekte ve bozulma yapabilmektedirler (Callewaert vd., 2000).

*Enterococcus* cinsine ait bakteriler, fekal kirliliğin göstergesi olarak karşımıza çıkabilirler ve gıdalarda üretim aşamalarında hijyenik olmayan koşullar oluşturabilirler. Buna bağlı olarak gıdalarda bulunmaları kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilirken hem fermente gıdalarda kötü üretim koşulları hemde kontaminasyon seviyesinin bir göstergesi olarak bilinirler. Bu özelliklerinden

dolayı enterokoklar su ve bazı gıda örneklerinde hijyen indikatörü olarak kullanılmaktadırlar (Arizcun vd., 1997; Franz vd., 1999; Giraffa, 2003; Lukaskova ve Sustackova, 2003; Hugas vd., 2003). Bunun yanı sıra son yıllarda enterokokların neden olduğu hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda büyük oranda artış gözlenmektedir (Hoşgör, 1996). Enterokoklar, hastane enfeksiyonu olan bakteriyemi etkenleri arasında 3. sırada, cerrahi yara ve üriner sistem enfeksiyonları arasında ise 2. sırada yer almaktadırlar (Klein, 2003; Yazgı vd., 2003; Şirin, 2004; Akdemir, 2010). *E. faecalis* ve *E. faecium*; enterokok türleri arasında insanlarda en fazla enfeksiyon sebebi olan ve gıdalardan yüksek sıklıkla izole edilen en önemli türlerdir (Murray, 1990; Klein, 2003; Meriç vd., 2004).

Enterokokların patojenitesine sebep olan en önemli faktörlerden biri bu bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri dirençtir (Yoğurtcu ve Tuncer, 2013). Enterokoklarda klinik olarak önemli temel antibiyotiklere karşı doğal (intrinsik) ve kazanılmış (ekstrinsik) olmak üzere iki direnç tipi vardır (Yüce, 2001; Garrido vd., 2014; Çepoğlu vd., 2016). Doğal direnç sefalosporin, beta laktam, sülfanomid, düşük düzeyde klindamisin ve aminoglikozidlere; kazanılmış direnç ise aminoglikozid, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol ve vankomisine karşı gelişebilmektedir (Çepoğlu vd., 2016). Doğal direnç, türe ve cinse özgü olmasının yanı sıra enterokok türlerinin tamamında gözlenir ve genetik determinantları kromozomal DNA üzerinde kodludur. Kazanılmış direnç ise; genellikle DNA mutasyonları, transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genoma transferi sonucu oluşmaktadır (Demirgöl, 2015; Akgül, 2016). Penisilinler, aminoglikozidler ve glikopeptidler enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotikleri oluşturur (Meriç vd., 2004). Gentamisin ve streptomisin klinik uygulamalarda kullanılan iki önemli aminoglikozid grubu üyesi antibiyotiktir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile Dünya genelinde yüksek seviyede gentamisin (YSGD) (MİK  $\geq 500$   $\mu\text{g/mL}$ ) ve streptomisin dirençli (YSSD) (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK)  $\geq 2000$   $\mu\text{g/mL}$ ) bakterinin izole edildiği rapor edilmiştir (Niu vd., 2016). Bakteri hücre çeperinden antibiyotik geçememesinden dolayı, enterokoklar aminoglikozid antibiyotiklere düşük düzeyde doğal dirençlidir. Enterokoklar, aminoglikozidlere plazmid aracılı aminoglikozid modifiye edici enzimlerle yüksek düzeyde direnç geliştirirler. Yüksek seviyede aminoglikozid direnci (YSAD); bakterilerin MİK değerlerinin oldukça yüksek düzeylerde

(gentamisin 500 µg/mL, streptomisin 2000 µg/mL) bulunması şeklinde tanımlanmıştır (Hoşgör, 1996). Gram pozitif bakterilerde en sık karşılaşılan aminoglikozid direnç biçimi aminoglikozid-modifiye edici enzimleri kodlayan genlerin kazanımıdır (Bismuth ve Courvalin, 2010; Niu vd., 2016). Hayvan yetiştiriciliğinde bilinçsiz ve kontrolsüz antibiyotik kullanımı kommensal bakterilerde önemli klinik ilaçlara direncin gelişiminin ve yayılmasının temel sebebi olduğu düşünülmektedir (Mathur ve Singh, 2005). Şimdiye kadar enterokoklara tek başına bir ilacın bakterisidal etkisi gösterilememiştir (Spiegel, 1988; Watanakunakorn, 1989). Ciddi enterokok enfeksiyonlarında bir beta laktam antibiyotik ve bir aminoglikozid antibiyotiğin kullanılması ile sinerjik etki sağlanır. Fakat yüksek seviyede aminoglikozid direnci enterokok varlığında bu iki antibiyotik arasında oluşan sinerji kaybolur (Spiegel, 1988; Weissmann vd., 1991). Bu nedenle enterokok kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde öncelikle yüksek seviyede aminoglikozid direncinin araştırılması gerekir (Hoşgör, 1996; Meriç vd., 2004). Bu amaçla rutinde yalnız streptomisin ve gentamisine yüksek düzeyde direnç araştırılması yeterlidir. Günümüze kadar YSA; fosfotransferazlar (APHs), asetiltransferazlar (AACs) ve nükleotidiltransferazlar (ANTs) olmak üzere 3 farklı aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) grubunun aktivitesi sonucu oluştuğu belirlenmiştir (Garrido vd., 2014; Niu vd., 2016). Yüksek seviyede gentamisin direncinin saptanması 2"-APH-6'-AAC enziminin varlığını gösterir ve en yaygın AME genidir (Hoşgör, 1996; Niu vd., 2016).

Antibiyotik direnci son yıllarda bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunu oluşturmaktadır. Tedavi amaçlı veya verim artırıcı olarak çiftlik hayvanlarında kontrolsüz ve uygunsuz antibiyotik kullanımının hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunan bakterilerin antibiyotik direnç özelliklerinin artmasında temel etken olduğu düşünülmektedir. Özellikle taşınabilir genetik materyaller üzerinde bulunan antibiyotik direnç genlerinin insan sindirim sisteminde diğer bakteri türlerine aktarımı gıda zinciri aracılığı ile antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına neden olmaktadır. Aminoglikozidler enfeksiyonların tedavisinde kullanılan hayati öneme sahip ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Son 10 yılda farklı ülkelerde yapılan çalışmalar ile çeşitli kaynaklardan izole edilen enterokok izolatlarının yüksek seviyede aminoglikozid direnci araştırılmış olmasına rağmen ülkemizde bu konu üzerine sadece klinik izolatlar üzerine yapılmış çalışmalar

bulunmaktadır. Yapılan taramalar sonucu ülkemizde süt ve süt rnlerinde YSAD enterokokların varlığı ve AME genlerinin araştırıldığına dair herhangi bir literatür verisine rastlanılmamıştır. Bu doğrultuda planlanan bu tez çalışmasında Antalya ve Isparta illerinde bulunan yerel üretici ve geleneksel ürün satılan market ve pazarlardan temin edilen 100 adet süt ve süt ürünleri (10 çiğ süt, 70 peynir, 10 tereyağ, 10 yoğurt) rneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* izolatlarının moleküler yöntemlerle tanısı yapıldıktan sonra izolatların antibiyotik direnç profilleri incelenmiş, izolatlarda AME genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır.





## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Enterokokların Genel Özellikleri

#### 2.1.1. Tarihçe

Taksonomide 1984 yılına kadar *Streptococcus* cinsi içinde yer alan enterokoklar, 1899 yılında Thiercelin tarafından ilk kez tanımlanmıştır (Franz vd., 1999; Giménez-Pereira, 2005). 1906 yılında Andrews ve Holder dışkıdan izole ettikleri mannitol ve laktozu asit oluşturarak fermente eden ve rafinozu kullanmayan Gram pozitif koklara *Streptococcus faecalis*, 1919 yılında ise Orla Jensen karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları farklı olan ikinci bir fekal bakteri türü olarak ise *Streptococcus faecium* bakterilerini tanımlamıştır (Yıldırım, 2007; Koç, 2009). Lancefield tarafından, 1933 yılında D grup antijene sahip olan fekal streptokoklar için serolojik bir sınıflandırma yapılmıştır (Franz vd., 1999; Franz vd., 2003; Berzeg, 2005). Bu sınıflandırma enterokokları, diğer streptokok cinsi bakteriden; pH 9.6'da, 10 °C ve 45 °C'de, % 6.5'luk NaCl varlığında üreyebilme, 60 °C'de 30 dk canlı kalabilme ve eskülünü hidrolize edebilmeleri ile ayırmaktadır (Klein, 2003). Sherman, 1937 yılında streptokokları piyojenik, viridans, laktik ve enterokoklar olmak üzere dört ayrı gruba ayırmıştır. Sherman'ın sınıflandırması, Lancefield'in yaptığı serolojik sınıflandırmaya uymaktadır (Murray, 1990; Devriese ve Pot, 1995; Franz vd., 1999; Franz vd., 2003; Giménez-Pereira, 2005; İşleroğlu vd, 2008).

*Streptococcus* cinsinden değişik bir genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle *S. faecalis* ve *S. faecium*'un farklı bir cinse alınmalarını ilk olarak Kalina (1970) önermiştir. *Streptococcus* cinsi daha sonra fizyolojik testler, karşılaştırmalı serolojik çalışmalar ve süperoksit dismutaz enzim analizleri ile nükleik asit hibridizasyonu (DNA:DNA ve DNA:RNA) gibi moleküler tanımlama tekniklerinin geliştirilmesiyle beraber *Streptococcus*, *Lactococcus* ve *Enterococcus* olmak üzere 3 ayrı cins olarak anılmaya başlanmıştır (Devriese ve Pot, 1995; Franz vd., 2003; Klein, 2003; Şirin, 2004; Berzeg, 2005). *S. faecalis* ve *S. faecium* olarak bilinen bakteriler, yeni sınıflandırmada *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak adlandırılmıştır (Domig vd., 2003; Klein, 2003).

Şimdiye kadar 32'den fazla enterokok türü tanımlanarak, farklı gruplara ayrılmıştır. *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* *E. faecalis* grubunu; *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. porcinus*, *E. villorum* *E. faecium* grubunu; *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus* *E. avium* grubunu; *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. flavescens* *E. casseliflavus* grubunu; *E. cecorum* ve *E. columbae* *E. cecorum* grubunu; *E. dispar*, *E. asini*, *E. pallens* *E. dispar* grubunu; *E. saccharolyticus* ve *E. sulfureus* ise *E. saccharolyticus* grubunu oluşturmaktadır (Williams vd., 1991; Franz vd., 1999; Klein, 2003). *E. faecium* ve *E. faecalis* en çok dikkat çeken iki türdür ve çeşitli fermente gıdaların üretiminde önemli rolleri olduğu gibi probiyotik olarak da kullanılmaktadırlar (Franz vd., 1999; Franz vd., 2003; Klein, 2003; Galindo-Cuspinera vd, 2003).

### **2.1.2. Morfoloji, üreme ve biyokimyasal özellikleri**

Enterokoklar insan ve hayvanların ağız, üretra, safra yolları, intestinal sistemlerinin doğal flora elemanı olan, klinik ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli laktik asit bakterileridir (LAB). *Enterococcus* cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunmakta olup, insan ve hayvan kaynaklı fekal materyaller tarafından (kanalizasyon ve hayvan gübresi gibi) kontamine olmuş çevrelerde (toprak, su yüzeyi, bitkiler, sebzeler ve böceklerde) yaygın olan homofermentatif LAB'dır (Klein vd., 1998; Franz vd., 1999; De Vuyst, 2000; El- Din vd., 2002; Franz vd., 2003; Domig vd., 2003; Linaje vd., 2004; Çaylan vd., 2004; Cariolato vd., 2008; Özden Tuncer vd., 2013; Yoğurtcu ve Tuncer, 2013, Tuncer vd., 2014; Said vd., 2016). Bu kaynakların dışında enterokoklar deniz ürünlerinde, süt ürünleri gibi hayvansal kaynaklı gıdalarda, sebzelerde ve fermente gıdalarda da görülmektedir (Hayes vd., 2003; Kühn vd., 2003). Bununla birlikte, günümüzde bu bakteriler hastane ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli fırsatçı patojenler olarak tanımlanmaktadır (Gawryszewska vd., 2017). Geçmiş yıllarda LAB cinsleri arasında özellikle *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* ve *Leuconostoc* üyesi bakteriler incelenmekte iken son yıllarda yapılan genetik çalışmalarda *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* cinsleri üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Temiz ve Yılmaz, 2003; Okcu vd, 2011). Enterokoklar Gram pozitif, oksidaz negatif, ikili ya da kısa zincirler halinde bulunan aerobik veya fakültatif anaerobik koklardır. Endospor oluşturmazlar ve sıvı besiyerlerinde dipte çökelti şeklinde, bulanıklık oluşturmadan

ürerler. Sitokrom enzimi içermedikleri için katalaz aktiviteleri yoktur. Ancak *E. faecalis* kan içeren besiyerlerinde üretildiğinde bazen zayıf bir yalancı katalaz reaksiyonu verebilir (Franz vd., 1999; Karakaş, 2005; İşleroğlu, 2008; Akdemir, 2010; Kajihara vd., 2015). Tüm enterokok suşları lösinaminopeptidaz (LAP) oluşturur (Murray, 1990; Ruoff vd., 1990) ve L-pirolidonil- $\beta$ -naftilamidi (PYR) reaksiyonları pozitifdir (Sayiner, 2008).

Enterokoklar, soğuk ve nemli toprakta 12 hafta kadar canlı kalabilirler. Çoğu 60 °C'de 30 dk ısıtmaya dirençlidir ve pH 9.6'da 10–45 °C'de ve % 6.5 NaCl varlığında üreyebilirler. % 40 safra içeren ortamda eskülini hidrolize eder ve *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus* hariç PYR üretirler. Bu reaksiyon onları grup A dışı streptokoklar, *Leuconostoc* ve *Pediococcus*'dan ayırmada önemlidir (Giménez-Pereira, 2005; Berzeg, 2005). İstisna olarak *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* ve *E. columbae* türleri % 6.5 NaCl varlığında yavaş gelişme gösterirler veya hiç gelişmezler. Enterokoklar 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü (TCC) indirgeyebilirler (Franz vd., 1999; Klein, 2003; Foulquié Moreno vd., 2006; Fisher ve Phillips, 2009). *E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı enterokok türleri hareketlidir (Koç, 2009).

Enterokokları diğer Gram pozitif, katalaz negatif koklardan ayırmak büyük önem taşımaktadır. Enterokoklar, *Streptococcus* cinsinden % 6.5 NaCl varlığında ve 10 °C'de gelişebilme özellikleri ile ayrılırlar. Ancak *Pediococcus*, *Lactococcus* veya *Tetragenococcus* cinsinden ayırt edilmesi çok zordur. Bunun için fermentasyon özelliği, enzim aktivitesi, farklı sıcaklık ve karbon kaynaklarının bulunduğu ortamlarda gelişmesi gibi faktörler dikkate alınmaktadır (Klein, 2003; Said vd., 2016). Enterokokları izole etmek için eskülinli safralı azidli agar, kanamisinli eskülinli azidli agar, sitratlı azidli ve tween-80 li karbonatlı agar, talyum asetatlı agar ve kristal viyoleli azidli agar gibi besiyerleri kullanılır (Berzeg, 2005). Kan içeren besiyerinde büyük, gri, parlak ve buğulu görünümde koloniler oluşur ve  $\alpha$  veya  $\beta$  hemolitik ya da non-hemolitikdir (Akpınar Kankaya, 2017).

## 2.2. Enterokokların Gıdalarla İlişkisi

Enterokoklar; çevrede çok geniş bir alana yayılmış olup, insan ve hayvan sindirim sisteminden, topraktan, çeşitli su kaynaklarından, bitkilerden ve çeşitli gıdalardan sıklıkla izole edilmektedirler (Klein, 2003; İnoğlu, 2013; Said vd., 2016; Gawryszewska vd., 2017). Et ve et ürünlerinde, süt ve süt ürünlerinde, özellikle fermente ürünlerde sıcaklık, pH ve tuza karşı dirençli olmaları nedeniyle sayıları yüksek düzeylere çıkabilmekte ve bozulma yapabilmektedirler (Callewaert vd., 2000; Hayes vd., 2003; Kühn vd., 2003). Enterokoklar özellikle et ve süt ürünlerinin doğal mikrobiyotasının bir parçası olmaları nedeniyle, bu ürünlerin fermentasyonunda doğal starter kültürler arasında yer almaktadır (Klein, 2003; Giraffa, 2003).

Özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilen bazı geleneksel peynir ve sosislerin olgunlaşması ve aroma gelişimi starter kültürler kullanılmadan, doğal floraya bağlı olarak yapılmaktadır. Ev yapımı bu ürünler yüksek pH'ya sahip olmaları nedeniyle enterokoklar için iyi bir gelişme ortamı oluşturmaktadır. Böylece *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans*'ın süt ürünlerinde yüksek oranda bulunmasının yanı sıra peynirin olgunlaşmasına ve lezzetin gelişmesine de katkı sağlamaktadır. Peynir ve sosis gibi fermente gıdalarda doğal yolla üretimi gerçekleştirilen bu ürünler birçok ülkede sevilerek tüketilmektedir. Farklı gelişme koşullarına dayanıklılıkları nedeniyle peynirlerde enterokok sayısı  $10^4$ - $10^7$  kob/g arasında değişmektedir (Giraffa, 2002; Franz vd., 2003; Karakaş, 2005; Tuncer, 2009).

### 2.2.1. Enterokokların süt ve süt ürünleri ile ilişkisi

Enterokoklar; gıdalarda uzun süre fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ancak son zamanlarda süt ürünlerinin genel florasının bir parçası olarak da dikkat çekmektedir. Özellikle Akdeniz ülkelerinde çiğ süttten üretilen peynirlerden sıklıkla izole edilmektedirler (Franz vd., 2003; Morandi vd., 2015).

*Enterococcus* cinsi bakteriler; süt ve süt ürünlerinde birçok role sahiptir ve Feta, Mozzarella ve Cebreiro gibi farklı Avrupa tipi peynirler başta olmak üzere peynir endüstrisinde starter kültür kombinasyonunda kullanılmaktadırlar. *E. faecalis*,

*E. faecium* ve *E. durans* süt ürünlerinde en sık rastlanan türlerdir (Galindo-Cuspina vd., 2003; Giraffa, 2003; Tuncer, 2009; Demirel ve Gürler, 2016). Özellikle Kuzey Avrupa ve Portekiz, İspanya, İtalya ve Yunanistan gibi Güney Avrupa ülkelerinde çiğ veya pastörize süttten üretilen çeşitli geleneksel peynirlerde *E. faecium*'un çok sayıda bulunması genellikle peynir üretimi sırasında hijyen uygulamalarının zayıf olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir (El-Din vd., 2002; Saavedra vd., 2003; Karakaş, 2005). Diğer taraftan peynirlerde *E. faecium*'un bulunması, bu ürünlerin karakteristik organoleptik özelliklerinin ortaya çıkmasına yardımcı olmasının yanı sıra enzim aktiviteleri ile primer ve sekonder metabolitler oluşturarak, peynirlerin aromasının iyileştirilmesine de katkıda bulunmaktadır (Giraffa, 2003; Saavedra vd., 2003; Hugas vd., 2003). *E. faecium*, Akdeniz ülkelerinde geleneksel peynirlerin üretimi sırasında; asidifikasyon, proteoliz, sitrat kullanımı, uçucu aromatik bileşikler üretme gibi fonksiyonel özellikleri sayesinde bir çok geleneksel fermente gıdanın tat, koku ve aromasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle bazı gıdaların fermantasyonunda duyuşal özellikleri arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (El-Din vd., 2002; De Vuyst, 2000; Cocconcelli vd., 2003). Bu bakteri peynir üretiminde proteolitik enzim üretimi ile kazeinin parçalanmasını sağlayarak ve esterazlarla süt yağını hidrolize ederek peynir üretimine fayda sağlamaktadır (El-Din vd., 2002). Peynirin olgunlaştırılmasını hızlandırmak, istenen tadı elde etmek ya da probiyotik özelliklerinden yararlanmak; *E. faecium* türlerinin yardımcı kültür olarak kullanılma nedenidir (Giraffa, 2003). Ancak olgunlaşmış peynirlerde enterokokların varlığının kabul edilebilir tada katkı sağlayıp sağlamadığı tam olarak bilinmemektedir. Yüksek sayıda enterokok bulunması peynirlerin bazı organoleptik özelliklerinde bozulmaya neden olabilmektedir. Aynı zamanda enterokok suşlarının patojen özellik taşıyabildiğinden, starter kültür olarak kullanılacak suşların seçiminde bu hususun göz ardı edilmemesi gerekir (İnoğlu ve Tuncer, 2013; Ertürkmen, 2014).

Geleneksel peynirlerde enterokok türlerinin sıklıkla izole edilmesi, son yıllarda bu alanda yapılan çalışma sayısını arttırmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından geleneksel peynir örneklerinde enterokokların bulunma sıklığı veya ürün kalitesi üzerine etkisini hedef alan çalışmaların bazıları aşağıda özetlenmiştir (Çıtak vd., 2004). Giraffa vd. (2000), Picante peynirinden izole edilen *E. faecium* suşlarının; peynirlerde sitrat metabolizmasını kullanarak olgunlaştırma sırasında asetaldehit, diasetil, aseton gibi uçucu bileşikleri oluşturarak peynir aromasına katkıda

bulduğunu bildirmişlerdir. El-Din vd. (2002), *E. faecium*'un çiğ sütteki baskın flora olmasına bağlı olarak, peynirlerde sık rastlanma nedenlerinin başında, yüksek sıcaklık, tuz ve aside olan toleranslarından ileri geldiği belirtilmiştir. Gülmez ve Güven (2002), *E. faecalis* INIA4 suşu ilave edilerek üretilen peynirlerin, duyuşal analizlerinde kontrol örneğine göre daha fazla puan aldığını bildirmişlerdir. Çıtak vd. (2004), 30 adet Türk tipi beyaz peynir örneğinden izole edilen 101 adet *Enterococcus* izolatından; 62 adet *E. faecalis*, 25 adet *E. faecium*, 7 adet *E. durans*, 5 adet *E. mundtii* ve 2 adet *E. hirae* olduğu belirtilmiştir. Belicová vd. (2007), Slovak Bryndza peynirinden elde edilen 310 adet enterokok izolatından 178 adet *E. faecium*, 68 adet *E. durans*, 49 adet *E. faecalis*, 8 adet *E. italicus*, 3 adet *E. gallinarum*, 3 adet *E. casseliflavus* ve 1 adet *E. hirae* olduğu tespit edilmiştir. Tuncer (2009) tarafından yapılan çalışmada tulum peynirinden 17 *E. faecium*, 11 *E. durans* ve 11 *E. faecalis* olmak üzere toplam 39 *Enterococcus* izolatı elde edildiği belirtilmiştir. Jackson vd. (2010), 122 adet süt sığırı işletmesinden toplanan örneklerden elde edilen 718 adet izolatın; % 90.7'sinin *E. hirae*, % 40.7'sinin *E. faecalis* ve % 39'unun *E. faecium* türü üyesi olduğu bildirilmiştir. Jamet vd. (2012), 126 Fransız peynirinden elde edilen 337 *Enterococcus* izolatının % 81'i *E. faecalis*, % 13'ü *E. faecium* ve % 6'sı *E. durans* türü olduğu belirtilmiştir. Yoğurtçu ve Tuncer (2013), 32 tulum peynirinden izole edilen 47 enterokok izolatının 21'inin *E. faecium*, 14'ünün *E. durans* ve 12'sinin *E. faecalis* olduğunu rapor etmiştir. Perin vd. (2014), keçi sütünden izole ettikleri 29 LAB'sinin 18'inin *Enterococcus* cinsine ait olduğunu bildirilmiştir. Akoğlu vd. (2017), 50 adet Mengen peyniri örneğinden toplam 117 adet LAB'si izole edilmiş ve 9'u *E. faecium*, 4'ü *E. faecalis* ve 2'si *E. durans* olarak belirlenmiştir. Russo vd. (2018), iki Sicilya peynir türü örneklerinden elde edilen 110 enterokok izolatının % 35'i *E. faecalis*, % 35'i *E. durans* ve % 28'i *E. faecium* türü üyesi olduğu tespit edilmiştir.

### 2.3. Antibiyotik Direnç

Antibiyotikler, mantar ve benzeri mikroorganizmalar tarafından üretilen, mikroorganizmaların ve başka canlıların gelişmesini durduran (biyostatik) ve hatta bunları öldüren (biyosidal) doğal ya da kimyevi maddeler olarak tanımlanmaktadır (Topal vd., 2013). İlk defa İskoç bakteriyolog Alexander Fleming'in 1929 yılında gözlediği ve 1940 yılında Chain ve Flarey'in *Penicillium notatum*'un salgılarından

elde edilen ve penisilin adı verilen ilacın birçok patojen mikroorganizmaya karşı öldürücü etkide bulunmasının keşfedilmesi büyük bir devrim olmuştur (Berzeg, 2005). Son 50 yılda antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıkları üzerinde oldukça faydalı olduğu görülmüş ve eskiden öldürücü olduğu bilinen pek çok hastalığın tedavisinde vazgeçilmez hale gelmiştir (Yalman, 2014).

Bir bakterinin, antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği “direnc” olarak tanımlanmaktadır. Direnc gelişimi gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımının bir sonucu olmasının yanı sıra bakterilerin olumsuz çevre koşullarına adapte olabilmek için geliştirdiği bir savunma mekanizmasıdır (Yüce, 2001; Yavaş, 2015). Enterokokların patojenitesine katkıda bulunan önemli faktörlerin başında bu bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnc gelmektedir (Yoğurtçu ve Tuncer, 2013). Antibiyotikler çevredeki çoğu bakteriyi öldürebilir ancak dirençli bakteriler kendilerini yeniden düzenleyerek antibiyotik direnc genlerini diğer bakteri türlerine aktarabilir (Doyle, 2001). Tarihteki ilk direnc mekanizması 1940’lı yılların ortalarında penisilin yaygın biçimde kullanılmaya başlanması sonucu *Staphylococcus aureus* suşlarında penisilinazların varlığıyla gösterilmiştir (Berzeg, 2005). Genel olarak, antibiyotik direncindeki artış için ana risk faktörünün antibiyotiklerin yaygın kullanımı olduğu kabul edilmektedir. Bu durum hayvan ve insanlarda; dirençli bakteriler ile direnc genlerinin ortaya çıkmasına ve yayılmasına yol açmaktadır (Lukasova ve Sustackova, 2003; Mathur ve Singh, 2005). Son yıllarda yapılan araştırmalar antibiyotik dirençli mikroorganizmaların gıda yoluyla insanlara geçebileceğini göstermiştir ve antibiyotiklere karşı artan direnc sorunu tüm dünyayı tehdit etmektedir (Akçam vd., 2004; Demirel ve Gürler, 2016). Antimikrobiyal direnc bu sebeple, insan ve halk sağlığını direk olarak ilgilendirmesi açısından çok önemli bir hale gelmiştir (Reuland vd., 2014). Hayvanlardan insanlara antibiyotik dirençliliğinin aktarılabilmesi ilk kez 1969 yılında Swann Komitesi bildirmiştir (Kılıç, 2004). Ancak 1940’lı yıllarda antibiyotiklerin kullanılmadığı bazı adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakteriler bulunduğu; antibiyotik direncinin yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğu da belirtilmektedir (Yüce, 2001).

Antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarının bağırsak florasında bulunan antibiyotik dirençli mikroorganizmaların, hayvan beslenmesinde büyüme destekleyici olarak kullanılması, dirençli *E. faecium* türlerinin ortaya çıkmasında seçici ajan rolü oynamalarına neden olmuştur (Quednau vd., 1999; Butaye vd., 2000; Giraffa, 2002; Cocconcelli vd., 2003; Koç, 2009; Demirel ve Gürler, 2016; Şanlıbaba ve Şentürk, 2018). Hayvan besiciliğinde kullanılan bu antimikrobisidler arasında bilinçsizce insan tedavisinde kullanılan antibiyotikler de yer almaktadır (Bozkurt ve Leblebicioğlu, 2015). Bu antibiyotiklere kazanılan diğer mekanizma ise klinik uygulamalarda kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen çapraz direnç olarak değerlendirilmektedir (Emborg vd. 2003, Bağcıgil vd. 2015, Hashem vd. 2015). Enterokoklar klinik uygulamalarda kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençlidirler (Lukasova ve Sustackova, 2003). Bakterilerin antibiyotik varlığında bile üreyebilmeleri ve hastalık yapabilmeleri, antibiyotik direncine sahip olmalarından kaynaklanır (Gökalp, 2015). Amerika’da *E. faecium*, hastane enfeksiyonlarına en sık neden olan ikinci bakteri türüdür ve son yıllarda en sık ortaya çıkan vankomisin dirençli enterokoklar (VRE)’dir (Salminen vd., 1998; De Vuyst vd., 2003; Berzeg, 2005; Karakaş, 2005). Bazı kaynaklarda *E. faecium*’un antibiyotiklere karşı *E. faecalis*’ten daha dirençli olduğu belirtilmektedir (Quednau vd., 1999).

Vankomisin ve teikoplanin’e karşı olan direnç, gıda kaynaklı enterokoklar arasında en sık izole edilen direnç fenotipidir (Giraffa, 2002). 1980’li yılların sonunda ilk defa glikopeptidlere karşı dirençli enterokoklar (GRE) tespit edilmiş ve sebep olduğu enfeksiyon çok zor tedavi edilebilmiştir (Peters vd., 2003). Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlerin önemi, çoklu ilaç direnci gösteren türlere ya da penisilin, ampisilin gibi antibiyotiklere karşı alerji gösteren kişilerin klinik tedavisinde kullanılmalarından kaynaklanmaktadır (Giraffa, 2002; Koç, 2009).

Pastörize ve çiğ sütler, et ve et ürünleri, hazır gıdalar, probiyotik kültür gibi ürünlerde antibiyotiğe dirençli enterokokların (ARE) varlığı tespit edilmiştir ve bu ürünler antibiyotik direncinin gıda zincirine yayılması riskini doğurmaktadır (Giraffa, 2002). *E. faecium* süt endüstrisinde, özellikle de peynir üretiminde starter olarak kullanılmasına rağmen henüz süt ürünlerinde VRE ile ilgili bir enfeksiyona sebep olduğu rapor edilmemiştir (Koç, 2009). Gıda mevzuatları bu tür bakterilerin gıdalarda varlıklarını bir hijyen indikatörü olarak kabul ediyor olsa da,



antibiyotiklere direnç gıda güvenliği kriteri olarak değerlendirilmemektedir (Dinç vd., 2012).

### 2.3.1. Antibiyotiklerin sınıflandırılması

Antibiyotiklerin sınıflandırılmasında çeşitli kriterler dikkate alınmaktadır. Bu kriterler; etki mekanizmaları, hedef hücreye olan etkileri (etki güçlerine göre), etki gösterdiği mikroorganizma grubu, etki spektrumu, immün modülatör etkileridir (Büyükkaya Kayış, 2014). Enterokoklar, klinik olarak önemli antibiyotiklere karşı doğal ve kazanılmış direnç için çeşitli mekanizmalar taşır ve antibiyotik direnç genlerinin aktarılmasında etkili genetik değişim mekanizmalarına sahiptir (Garrido vd., 2014). İntrensek direnç (doğal direnç), enterokokların karakteristik özelliklerinden biri olup kromozomal DNA kaynaklıdır ve antibiyotik kullanımı ile ilişkisi yoktur (Murray, 1990; Teuber vd., 1999; Foulquié Moreno vd., 2006; Alp, 2013; Demirgöl, 2015). Enterokoklar pek çok antibiyotiğe karşı doğal dirençli olmaları, başka antibiyotiklere kolay direnç göstermeleri ve adaptasyonlarının iyi olması nedeniyle diğer patojenlerden daha avantajlıdırlar (İnoğlu, 2013). Enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozomidlere, trimetoprim-sulfometaksazole ve aminoglikozidlere (düşük seviyede), kinopristin/dalfopristine karşı kalıtsal olarak dirençlidirler (Oryaşın, 2008; Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Şanlıbaba ve Şentürk, 2018).

Tüm enterokoklarda düşük oranda (MİK, 62-500 µg/mL) intrensek aminoglikozid direnci görülmektedir. Bu durum aminoglikozidlerin hücre içine girişini kolaylaştıran penisilinlerle birlikte kullanımı sonucu çözülebilmektedir (Garrido vd., 2014). En sık görülen enterokoklara bağlı nozokomiyal enfeksiyonlar üriner sistem enfeksiyonlarıdır ve bunları cerrahi yara enfeksiyonları ile bakteriyemiler izler (Murray, 1998). Antibiyotik tedavisi altındaki hastalarda, enterokokların intrensek antimikrobik dirençleri, bu bakterilerin hayatta kalmalarına ve çoğalmalarına neden olur. Bu nedenle geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda süper enfeksiyonlara yol açarlar (Berzeg, 2005). Tüm enterokoklar, düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlerinin (PBP5); penisilin, ampisilin ve sefalosporinler dahil diğer beta laktam grubu antibiyotiklere karşı, düşük ilgiye sahip olmasından dolayı beta laktam grubu antibiyotiklere karşı göreceli olarak dirençlidir. *E. faecalis* için

penisilin MİK değeri streptokoklara göre 10 ile 1000 kat daha fazladır (Koç, 2009). Ekstresek direnç (kazanılmış direnç); dirençli bir mikroorganizmanın direnç genini, duyarlı mikroorganizmalara aktarması veya mikroorganizmaların genlerinde oluşan mutasyonlar sonucunda meydana gelen genetik değişikliklerden dolayı zaman içerisinde duyarlı olduğu antibiyotiğe karşı direnç göstermesini ifade etmektedir (Yüce, 2001; Yalman, 2014). Enterokoklarda yeni DNA parçası transferinden en fazla sorumlu olan mekanizma konjugasyondur. Buna ek olarak gen transferi transformasyon ve transpozonlar aracılığı ile de olmaktadır (Teuber vd., 1999; Yüce, 2001; Oryaşın, 2008; Demirgöl, 2015; Şanlıbaba ve Şentürk, 2018). Tetrasiklin direnci, enterokoklarda konjugasyon yoluyla kazanılmış direncin en tipik örneğidir (Koç, 2009). Enterokoklar; vankomisine, kloramfenikole, eritromisine, tetrasikline, florokinolona, penisilinlere, yüksek seviye aminoglikozidlere ve klindamisinlere karşı sonradan kazanılmış direnç geliştirmektedirler (Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Yalanca 2009, Garrido vd. 2014). Bunlar arasında en önemlileri yüksek seviyede aminoglikozid direnci, glikopeptid direnci, beta laktamaz yapımı veya diğer mekanizmalarla gelişen yüksek penisilin direncidir (Berzeg, 2005).

İnsanların tedavisinde kullanılan antibiyotikler ile hayvanlarda gelişim artırıcı olarak kullanılan antibiyotikler arasında çapraz direnç bulunmaktadır ve hayvan gelişiminde kullanılan antimikrobialler, insanlarda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlara karşı dirence neden olmaktadır (Emborg vd., 2003). Çapraz direnç; bir antibiyotiğe karşı dirençli olan mikroorganizmanın, benzer mekanizma ile etki eden diğer antibiyotiklere karşı direnç göstermesidir. Genellikle eritromisin, neomisin, kanamisin gibi benzer özellikteki antibiyotikler arasında görülür (Yalanca, 2009). Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizmaları Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etki şekilleri ve direnç mekanizmaları (Davies ve Davies, 2010)

<b>Antibiyotik sınıfları</b>	<b>Örnek antibiyotikler</b>	<b>Hedef</b>	<b>Direnç mekanizması / mekanizmaları</b>
β-laktamlar	Penisilinler, sefalosporinler, penemler, monobaktamlar	Peptidoglikan biyosentezi	Hidroliz, efluks, değiştirilmiş hedef
Aminoglikozidler	Gentamisin, streptomisin, Spektinomisin	Translasyon	Fosforilasyon, asetilasyon, nükleotidilasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Glikopeptidler	Vankomisin, teikoplanin	Peptidoglikan biyosentezi	Yeniden programlanmış peptidoglikan biyosentezi
Tetrasiklinler	Minosiklin, tigesiklin	Translasyon	Monooksijenasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Makrolidler	Eritromisin,	Translasyon	Hidroliz, glikolizasyon, fosforilasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Linkozamidler	Klindamisin	Translasyon	Nükleotidilasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Streptograminler	Sinersid	Translasyon	C-O liyaz (tip B streptograminler), asetilasyon (tip A streptograminler), efluks, değiştirilmiş hedef
Oksazolidinonlar	Linezolid	Translasyon	Efluks, değiştirilmiş hedef
Fenikoller	Kloramfenikol	Translasyon	Asetilasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Kinolonlar	Siprofloksasin	DNA replikasyonu	Asetilasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Primidinler	Trimetoprim	C1 metabolizması	Efluks, değiştirilmiş hedef
Sülfonamidler	Sülfametoksazol	C1 metabolizması	Efluks, değiştirilmiş hedef
Rifampisinler	Rifampin	Transkripsiyon	ADP-ribozilasyon, efluks, değiştirilmiş hedef
Lipopeptidler	Daptomisin	Hücre membranı	Değiştirilmiş hedef
Katyonik peptidler	Kolistin	Hücre membranı	Efluks, değiştirilmiş hedef

### 2.3.1.1. Beta-laktamlara direnç

Enterokoklarda ilk kez 1983 yılında tespit edilen ve aminoglikozid ile beta laktam sinerjist etkisinin kaybolmasına neden olan penisilin direnç mekanizması  $\beta$ -laktamaz sentezidir (Aslan, 2011). Beta laktamaz antimikrobiyali; beta laktam halkasını parçalayarak etkisiz hale getiren enzimlerdir. Parçalanmayı engellemek için  $\beta$ -laktam antimikrobialler,  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile kombine edilebilirler. En sık kullanılan beta laktamaz inhibitörleri; klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktamdır (Saran ve Karahan, 2010). Genişletilmiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar dünya çapında hızla ortaya çıkmaktadır (Reuland vd, 2014). Enterokoklar bakteriyostatik etkiye sahip penisilin, ampisilin, piperasin, immipenem gibi  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere doğal olarak düşük seviyede direnç gösterirler (Huycke vd., 1998).

Enterokok cinsi bakteriler iki ayrı direnç mekanizması ile  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç kazanırlar. Direncin majör mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilinin hücre içine girişinin azalmasıdır (Çetinkaya vd., 2000; Arbeloa vd., 2004; Rice vd., 2005).  $\beta$ -laktam ajanlara dirençten öncelikle enzimler sorumludur (Yüce, 2001). Penisilin ve ampisilin gibi  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler, bakteriyel hücre duvarının olgun peptidoglikan tabakası sentezi sırasında peptit yan zincirlerinin çapraz bağlanmasını katalize eden DD-transpeptidazların işlevini engelleyen subsratlar (PBP) olarak bakteriyel gelişimi inhibe ederler. PBP'ler  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerle modifiye edildiğinde etkisiz hale gelirler (Templer, 2006; Kristich vd., 2014). Özellikle Gram pozitif bakterilerde hücre duvarının yapısal bütünlüğü açısından peptidoglikan tabakası çok önemlidir ve PBP değişimine bağlı direnç daha sık gözlenmektedir (Yüce, 2001; Templer, 2006). Bir diğer direnç mekanizması ise; Gram negatif bakterilerin porin değişikliklerine bağlı olarak geçirgenliğin azalması ile dış membran proteinlerinde değişiklik meydana gelmesidir. Örneğin *E. coli*'de OmpF ve OmpC değişimleri ile  $\beta$ -laktamlara, *P. aeruginosa*'da özel bir kanal proteini olan OprD kaybı ile karbapenemlere direnç gelişir. Yine aktif pompa sistemi ile antibiyotiğin hücre içinde birikmesi engellenebilir. Örneğin *E. coli*, *marRAB* operonunun mutasyona uğraması sonucu  $\beta$ -laktamlar; tetrasiklin, kloramfenikol ve kinolon direnci geliştirebilir. Moleküler çalışmalar sonucunda 4 ayrı sınıf (A,B,C,D)  $\beta$ -laktamaz tanımlanmıştır.

A, C ve D sınıfı  $\beta$  -laktamazlar serin-ester aracılıklı işlev gören enzimler, B sınıfı ise çinko iyonuna gereksinim duyan metalloenzimlerdir (Yüce, 2001).

### **2.3.1.2. Glikopeptidlere direnç**

Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç ilk kez Uttley vd. (1988) tarafından bildirilmiş ve daha sonra tüm dünyada hızla yayılmıştır. Türkiye’de ise ilk VRE suşu Antalya’da saptanmış olup, 1998 yılında Vural vd. tarafından tespit edilmiştir (Yıldırım, 2007). Ülkemizde hastane izolatları arasında VRE yaygınlık oranı % 0-10 olduğu belirtilirken; hayvanlarda 2001 yılında, tavuk ve köpeklerden izole edilen enterokok suşlarının % 13-14’ünde vankomisin direnci saptanmıştır (Ünal ve Yıldırım., 2010). Vankomisin ve teikoplanin glikopeptid antibiyotikleri, enterokokal enfeksiyon tedavilerinde en son tercih edilen, çok etkili antibiyotiklerdir (Yoğurtçu, 2011; Aslan, 2011; Yıldız., 2014). Glikopeptid antibiyotikler, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezinde peptidoglikan polimerlerini oluşturacak öncü maddelerden olan D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanır ve hücre duvarı sentezini bozarlar. Vankomisin dirençli suşlarda ise ligaz enzimi D-ala-D-ala ucunun yapısını değiştirir ve D-ala-D-ala-laktat veya D-ala-D-ala-serin meydana getirir (Malathum ve Murray, 1999; Çetinkaya vd., 2000). Ancak peptidoglikan yan zincirine D-ala-D-ala yerine ligaz enzimi ile D-ala-D-laktat veya D-ala-D-serin’in sentezlenerek bağlanması sonucunda, vankomisinin buraya bağlanma yeteneği azalır, hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir (Çetinkaya vd., 2000, Klare vd., 2003). Direnç sınıflandırılması eskiden izolatların MİK değerlerine göre yapıyorken, günümüzde spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. VanA, VanB, ve VanD tipi direnç D-ala-D-ala-laktat, VanC ve VanE tipi direnç ise D-ala-D-ala-serin üretimi ile ilişkilidir (Malathum ve Murray, 1999; Çetinkaya vd., 2000). D-ala-D-ala-laktat ucunun oluşması antibiyotiğin bağlanma affinitesini yaklaşık 1000 kat, D-ala-D-ala-serin ucunun oluşması ise antibiyotiğin bağlanma affinitesini yaklaşık 7 kat azaltmaktadır (Kristich vd., 2014).

### **2.3.1.3. Makrolid ve linkozamidlere direnç**

Eritromisin gibi makrolid grubu antibiyotikler, duyarlı bakterilerin 50S alt ünitelerine geri dönüşlü olarak bağlanarak protein sentezini inhibe ederler (Templer, 2006).

Gram negatif bakterilerin dış zarı hidrofobik bileşikleri geçirmediği için bu bakteriler makrolid, linkozamid, streptogramin grubu (MLS) antibiyotiklere doğal dirençlidir (Yüce, 2001). Bu grup antibiyotikler enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmamasına rağmen penisilin alerjisi olan kişilerde makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin tercih edilir. Bu sebeple enterokoklar arasında bu grup antibiyotiklere karşı direncin görülme sıklığının arttığı düşünülmektedir (Kristich vd., 2011).

Bugüne kadar hedef modifikasyonu, antibiyotiğin inaktivasyonu ve dışarı akış sistemi olmak üzere üç farklı eritromisin direnç mekanizması tanımlanmıştır (Templer, 2006). Aerob ve anaerob Gram pozitif bakteriler arasında, makrolid grubu antibiyotiklere karşı en yaygın gözlenen kazanılmış direnç şekli, makrolidin ribozoma bağlanma affinitesini azaltan 23S rRNA alt ünitesinin metillenmesidir (Örneğin; *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *ermTR* genleri) (Yüce, 2001; Akpınar Kankaya vd, 2016). Bu modifikasyon linkozamidlerin de bağlanma affinitesini azaltmaktadır (Kristich vd., 2011; Garrido vd., 2014). En sık rastlanan makrolid direnç determinantları *erm* (Eritromisin ribozom metilasyon: erm) genleridir. Bu genler bir metiltransferaz enzimi kodlamaktadır (Jensen vd., 1999; Pechere, 2001; Jaglic vd., 2012; Garrido vd., 2014). Tanımlanmış *erm* genleri arasında enterokoklarda en sık rastlanana *ermB* genidir (Jensen vd., 1999; Jamet vd., 2012). Metilasyondan sorumlu enzimler *erm* gen bölgesince kodlanır. Çeşitli Gram pozitif bakterilerde 8 farklı *erm* gen sınıfı belirlenmiştir. Bu genler kromozom, plazmid veya transpozonlar üzerinde taşınır ve yapısal ya da indüklenebilir karakterdedir. Metilasyon, ribozomal bağlanma bölgesinin özelliklerini değiştirerek tüm MLS grubu antibiyotiklere çapraz direnç gelişmesine neden olur. Bu direnç *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium* ve *Bacteroides* gibi bakterilerde saptanmıştır (Yüce, 2001). Başka bir direnç mekanizması ise efluks pompalarıyla antibiyotik moleküllerinin bakteri hücrelerinden uzaklaştırılmasıdır (Örneğin; *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrC* ve *mreA* genleri). Makrolid direnci taşınabilir genetik elemanların horizontal transferi veya dirençli bakterilerin yayılması ile hayvanlardan insanlara aktarılabilmektedir (Garrido vd., 2014). Ayrıca *E. faecium*'da tanımlanan linkozamid nükleotidil transferaz tarafından katalizlenen linkomisin ve klindamisinin 3-(5'-adenilasyonu) diğer bir direnç mekanizmasıdır (Bozdoğan vd., 1999). Bu enzim *linB* geni tarafından kodlanmaktadır (Akpınar Kankaya, 2017).

#### 2.3.1.4. Tetrasikline direnç

Enterokoklarda tetrasiklin direnci klinik ve hayvansal kaynaklı gıda izolatlarında sıklıkla karşılaşılmaktadır (Yoğurtçu ve Tuncer, 2013; Morandi vd., 2015). Enterokoklarda genellikle tetrasiklin direnci ribozomal koruma sağlayan *tetM*, *tetO* ve *tetS* gibi genler de tanımlanmıştır (Aarestrup vd., 2000). Tetrasiklinler arasında çapraz direnç vardır. Doksisiklin ve minosiklin dışında herhangi bir tetrasiklin grubu antibiyotiğe dirençli olan bakteri bu grubun diğer üyelerinde de dirençlidir. Doksisiklin veya minosiklin dışında diğer tetrasiklin üyesi antibiyotiklere dirençli olan bakteriler bu antibiyotiklere duyarlı olabilir (Yüce, 2001). Klinik izolatlarda *tetM* geni genellikle Tn916 transpozonu üzerinde bulunur. Aynı zamanda konjugatif plazmid veya kromozom üzerinde de taşınabildiği tespit edilmiştir. Tetrasiklinin dışarı atılmasını sağlayan pompaların kodlanmasında *tetK* ve *tetL* genleri görevlidir (Leclercq, 1997). Diğer direnç genleri ise ribozoma bağlanarak onun yapısını değiştiren ve tetrasiklinin ribozomlarla birleşmesini engelleyen proteinleri kodlarlar (Garrido vd., 2014). *Campylobacter*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Bacteroides* ve *Neisseria* gibi birçok bakteride bulunan *tetM*, *tetO*, *tetQ* ve *tetS* genleri; sentezlenen sitoplazmik bir proteinin aktivitesi sonucu ilacın ribozoma bağlanmasını engeller (Yüce, 2001). *tetL* geni bir plazmidde taşınır ve efluks sistemini kodlayabildiği gibi ribozomal kaynaklı dirence de sebep olabilir (Klare vd., 2003). Tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan gen, tetrasiklin ile temas sonucu indüklenir. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yolu ile kazanılan direncin en tipik örneğidir (Murray 1998). Tetrasiklin direncine yol açan ikinci önemli mekanizma bakterilerde spontan mutasyonlar sonucu hücre geçirgenliğinin etkilenmesi ile ilaç alımının azalması şeklinde meydana gelmektedir. Tetrasiklin transport proteinlerini kodlayan genler (*tetA-G*, *tetK-L*) Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde bulunur (Yüce, 2001).

#### 2.3.1.5. Rifampine direnç

Rifampin, Gram negatif bakterilerde ve mikobakterilerde DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin  $\beta$ -altbirimine bağlanarak etki eden bir ilaçtır. RNA polimeraz enzimini kodlayan *rpoB* gen bölgesinde oluşan kromozomal mutasyonlar sonucu rifampine karşı direnç gelişir (Yüce, 2001). Bu durumun diğer bakteri kaynaklı

enfeksiyonların tedavisi sırasında kommensal enterokokların antibiyotiğe maruz kalması ile oluştuğu düşünülmektedir (Akpınar Kankaya vd, 2016). Ayrıca rifampin hidrofobik bir bileşik olmasından dolayı dış zardan geçemediği için Gram negatif bakterilerin çoğu bu ilaca doğal olarak dirençlidir (Spratt,1994). *In vitro* olarak doğal rifampin dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium* mutantlarının izole edildiği bilinmektedir (Kristich vd., 2011). *rpoB* mutasyonu ile meydana gelen rifampin direnci sefalosporinlere olan direnci etkilemezken, *rpoB* H486Y mutasyonunun sefalosporinlere olan direnci arttırdığı belirlenmiştir (Kristich vd., 2014).

### **2.3.1.6. Oksazolidinonlara direnç**

Gram pozitif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyel aktivite (MIK, 4 µg/mL) gösteren oksalizinon grubu üyesi linezolid çoklu ilaç direnci gösteren enterokoklar ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Murray 1998; Klare vd., 2003; Akpınar Kankaya; 2016). 23S ribozomal alt üniteye meydana gelen mutasyon linezolide karşı direnç oluşmasına neden olur ve direnç seviyesi mutasyona uğrayan rRNA genlerinin allellerinin sayısına bağlıdır. Linezolide dirençli suşlar aynı zamanda vankomisin, ampisilin, makrolidler, florokinolonlar, kloramfenikol, rifampin, gentamisin, nitrofurantoin ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi diğer antibiyotiklere karşı da direnç gösterebilirler (Jones vd., 2002).

### **2.3.1.7. Kinolonlara direnç**

Kinolonlar; geniş etki spektrumlu, yaygın kullanım alanına sahip ve aynı zamanda iyi farmakokinetik özellikleri olan antibiyotik grubudur (Ulusoy, 2010). Canlı mikroorganizmalardan elde edilen birçok antibiyotiğin aksine kimyasal yollarla elde edilen sentetik maddeler olmaları nedeniyle aslında antibiyotik değil, kemoterapötik maddelerdir ve günümüzde özellikle laboratuvar koşullarında çok sayıda kinolon molekülünün sentezlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Antimalarial bir ajan olan klorokin sentezi esnasında tesadüfen nalidiksik asidin keşfedilmesiyle kinolonlar klinik kullanımda yerini almaya başlamıştır. Birçok yazar kinolonları kuşaklara ayırarak incelemeyi tercih etmiştir. Nalidiksik asit, oksolinik asit, sinoksasin, piromidik asit, pipemidik asit, flumekin gibi kinolon türevleri birinci kuşak kinolonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Birinci kuşak kinolonların antimikrobiyel



aktivitesi; aerob Gram negatif bakterilere etkili, Gram pozitif aeroblara ve anaeroblara etkisizdir. Molekülün C-6 pozisyonuna bir flor eklenmesiyle oluşan yeni moleküller florokinolonlar olarak adlandırılmış ve ikinci kuşak kinolonlar olarak sınıflandırılmıştır (Andriole, 2005). İkinci kuşak kinolonların (siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin) Gram negatif etkinliği daha iyi olmasının yanı sıra Gram pozitif etkinliğe de sahiptirler. Siprofloksasin ayrıca güçlü anti-pseudomonal etki gösterir. Ancak anaerob etkinlikleri yoktur (Andriole, 2005; Van Bambeke vd., 2005). Üçüncü kuşak kinolonların (levofloksasin), özellikle pnömokoklara karşı artmış Gram pozitif etkinlikleri vardır ve anaeroblara da etkilidirler. Bu gruptan sadece levofloksasin halen kullanılmaktadır. Dördüncü kuşak kinolonlar (moksifloksasin ve gemifloksasin), pnömokoklara ve anaeroblara karşı güçlü aktiviteye sahiptirler (Andriole, 2005).

Kinolonlar enterokoklara karşı orta seviyede aktivite göstermelerine karşın, klinik uygulamalarda florokinolonların kullanılması enterokokların bu antibiyotiğe direnç kazanmasına neden olmaktadır (Demirgöl, 2015; Akpınar Kankaya vd., 2016). Tüm bakteri türlerinde fluorokinolonlara karşı oluşan direnç mekanizması DNA giraz enzimidaki mutasyonlar (GyrA, GyrB) kaynaklıdır. DNA giraz enzimi dört alt birimden oluşmuş olup, kinolonların asıl hedefi A alt birimidir ve bu alt birimi *gyrA* geni tarafından kodlanmaktadır. *gyrA* geni mutasyonları tüm bakterilerde tüm kinolon grubu antibiyotiklere karşı yüksek direnç oluşumundan sorumludur. *gyrB* geni mutasyonları ise özellikle *P. aeruginosa* ve *E. coli*'de gösterilmiştir. Ancak bu direnç tüm kinolonlara karşı olmayabilir (Acar ve Goldstein, 1997). Kinolonlar özellikle DNA süper sarmalının kontrolünde görevli tip II topoizomerazlara (DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV) bağlanıp fonksiyonlarını yerine getirmelerini engelleyerek bakteri gelişimini inhibe etmektedirler. DNA girazın GryA ve topoizomeraz IV'un ParC alt ünitelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda antibiyotiğin enzime bağlanması engellendiğinden enterokoklarda kinolon direnci ortaya çıkmaktadır (Akpınar Kankaya vd., 2016). Kinolonlara karşı gözlenen ikinci direnç mekanizması ise eflüks pompaları ile antibiyotiğin hücre dışına atılmasıdır. EmeA (Jung vd., 2010) ve EfrAB (Akpınar Kankaya vd, 2016) kinolon direnci için tanımlanan eflüks pompalarıdır. Aktif eflüks sistemi, *S. aureus* (Nor A) ve *Enterobacteriaceae* (MarA), *Pseudomonas* ve *Campylobacter* türleri gibi birçok Gram negatif bakteride gösterilmiştir (Yüce, 2001). Kinolonlara karşı tanımlanan bir

diğer direnç mekanizması ise Qnr ailesi proteinler tarafından DNA giraz ve topoizomerez IV'un kinolonlardan korunmasıyla sağlanmaktadır (Mascher vd., 2006).

### **2.3.1.8. Kloramfenikole direnç**

Kloramfenikol; Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde yaygın görülen bir enzim olup plazmid veya transpozonlar ile aktarılabilir. Enterokokların % 20-42'si kloramfenikole dirençlidir ve dirençten sorumlu esas mekanizma, plazmid üzerinde yer alan "cat" geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Ayrıca bir başka direnç mekanizması ise; efluks mekanizmasıdır. Esas direnç mekanizması plazmid kontrolünde sentezlenen ve intraselüler bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzim aktivitesidir. cat geni tarafından kodlanan kloramfenikol asetiltransferaz enzimi asetil-S-koenzim A aracılığıyla bir veya iki asetil grubunu kloramfenikol molekülünün hidroksil grubuna kovalent olarak bağlar. Kloramfenikolün asetilasyonu antibiyotiğin ribozoma bağlanmasını engeller ve ilaç ribozomlara bağlanamayınca protein sentezi normal şekilde devam eder (Trieu-Cuot vd., 1993; Yüce, 2001; Klare vd., 2003; Templer, 2006). Kloramfenikol direnci aynı zamanda 23S rRNA'da meydana gelen mutasyonlardan dolayı dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azalmasıyla, 3-O-fosfotransferazlar tarafından kloromfenikolün inaktive edilmesi veya 23S rRNA metiltransferaz ile hedef bölge modifikasyonu ile meydana gelebilir (Roberts ve Schwarz, 2009).

### **2.3.1.9. Aminoglikozidlere direnç**

Aminoglikozidler, yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisi için kullanılan geniş spektrumlu, *Streptomyces* (streptomisin, neomisin, kanamisin, tobramisin) ve *Micromonospora* (gentamisin ve sisomisin) cinsi funguslardan elde edilen doğal ya da yarı sentetik antibiyotiklerdir (Hoşgör, 1996; Mingeot-Leclercq vd., 1999). İlk aminoglikozid *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı inhibitör aktivitenin varlığı için farklı toprak bakteri kültürlerinin (*Streptomyces griseus*'tan izole edilen) taranmasıyla streptomisin keşfedilmiştir. 1943 yılında keşfedilen streptomisin, tüberküloza karşı etkili olan ilk antibiyotiktir ve 1944 yılında bu hastalığı olan bir kadın antibiyotik tedavisi uygulanarak iyileştirilmiştir. Uygulanan kombine tedavide

günümüzde streptomisin hala kullanılmaktadır ve amikasin veya kanamisin gibi diğer aminoglikozid antibiyotikler ikinci sırada tercih edilmektedirler. Bu keşif için S.Waksman 1952'de Tıpta Nobel Ödülü'nü almıştır (Jana ve Deb, 2006; Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

Aminoglikozid grubu antibiyotikler, aminoasitlere bağlanmış aminosiklitol çekirdeği (streptamin, 2-deoksistreptamin veya streptidin) olan glikozidik bağlarla karakterize kompleks bir bileşiktir. Buna ek olarak, amino şekerlere bağlı olmayan bir aminosiklitol olan spektinomisin veya aminosiklitol foraminini içeren bileşikler gibi diğer bileşikler de bu ailenin içinde bulunur. Aminoglikozidler öncelikle Gram negatif aerobik basiller, stafilokoklar ve diğer Gram pozitiflerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Ramirez ve Tolmasky, 2010) Gentamisin, tobramisin ve amikasinin etkinlikleri benzer olmakla birlikte, *Pseudomonas* enfeksiyonlarında tobramisin öncelikli olarak tercih edilir. Amikasin, diğer aminoglikozidlere dirençli bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde denenebilir. Streptomisin; tularemi, veba, bruselloz ve tüberküloz tedavisinde tercih edilir (Jana ve Deb, 2006).

Bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılması endişe vericidir. Küresel senaryoda, kommensal bakterilerde direncin gelişmesi ve yayılması, klinik olarak önemli ilaçların hayvancılıkta uygunsuz kullanılmalarıyla ilişkilendirilmektedir (Mathur ve Singh, 2005). Birçok ülke insan hastalıklarında tercih edilen kullanımları nedeniyle hayvancılıkta belirli antibiyotiklerin uygulanmasını yasaklamışlardır (Jaimee ve Halami, 2016). Bununla birlikte, aminoglikozidler, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı etkin bakterisidal etki göstermeleri nedeniyle çiftlik hayvanlarında terapi ve profilaksi için tavsiye edilir (Saran ve Karahan, 2010; Jaimee ve Halami, 2016).

Yüksek seviyede aminoglikozid direnci plazmid kodlu aminoglikozid modifiye eden enzim üretimiyle veya ribozomal mutasyonla (sadece streptomisin için) olur. Yüksek seviyede aminoglikozid direnci, 2000 µg/mL'nin üzerinde MİK değerleri olarak tanımlanır ve ciddi enterokok enfeksiyonlarında hücre duvarına etkili ajanlarla (β-laktam antibiyotik) bir aminoglikozidik antibiyotik kombine kullanılmaları halinde oluşan sinerjistik etkinin kaybolmasına sebep olur. Streptomisin ve

kanamisin antibiyotiklerine karşı yüksek seviyede direnç daha yaygındır. Gentamisin antibiyotiğine karşı yüksek seviyede direnç saptanırsa, streptomisin dışında hiçbir aminoglikozid antibiyotiğin kullanılmayacağı anlamını taşır. Bu nedenle enterokoklarda yüksek seviyede aminoglikozid direnci özel bir klinik önem taşımaktadır ve enterokoklarla oluşan ciddi enfeksiyonlarda bu iki ajanın (streptomisin ve gentamisin) araştırılması yeterlidir (Hoşgör, 1996; Berzeg, 2005; Yamazhan, 2007). Enterokoklar düşük bir hücre geçirgenliğine bağlı olarak orta seviyede doğal aminoglikozid direnci gösterirler. Bu orta seviyede doğal direnç (MİK 62-500 µg/L) ortama penisilin gibi β-laktam antibiyotiklerin eklenmesiyle aşılabilir. Penisilin aminoglikozidlerin hücreye girmesini kolaylaştırmaktadır (Garrido vd., 2014).

### **2.3.2. Aminoglikozid direnç mekanizmaları**

Aminoglikozidler, bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek ve mRNA'daki genetik bilginin doğru okunuşunu azaltmak veya bozmak yoluyla duyarlı bakteri hücreleri üzerine hızlı bakterisidal etki gösterirler. Streptomisin ribozomun 30S alt birimine, diğer aminoglikozidler ise ribozomun hem 30S hem 50S alt birimine bağlanırlar. Streptomisin protein sentezini inhibisyon etkisi daha belirgin iken diğer antibiyotiklerin genetik şifreyi yanlış okutma özellikleri ön plandadır (Chow, 2000). Aminoglikozid direncinde farklı doğal direnç mekanizmaları rol oynamaktadır (Garrido vd., 2014). Aminoglikozidlere karşı düşük düzeydeki direnç (MİK=8-256 µg/mL) hücre duvarı geçirgenliğindeki azalmaya bağlıdır. Yüksek düzeyli direnç (MİK >2000 µg/mL) ise aminoglikozidlerin hedef bölgelerindeki (ribozomdaki bağlanma bölgeleri) değişiklik sonucu veya aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi sonucu oluşur (Murray vd., 1998; Erbek vd., 2002). Aminoglikozidlere karşı bakteriyel direnç mutasyonlar, taşınabilir bozukluk ve edinilmiş direnç nedeniyle oluşur (Ramirez ve Tolmasky 2010). Aminoglikozidlere karşı bakteriyel direnç mekanizmaları, çok sayıda genetik ve biyokimyasal çalışmanın konusu olmuştur (Jana ve Deb, 2006). Enterokoklar aminoglikozidlere karşı üç farklı direnç mekanizmasına sahiptir (Chow, 2000). Bu mekanizmalar; bakteriyel hücreler içindeki antibiyotiğin hücre içi konsantrasyonunun azaltılması ile ilacın sitoplazmaya geçişinin engellenmesi, antibiyotiğin moleküler hedefinin değişmesi ve aminoglikozidin enzimatik

inaktivasyonudur (Jana ve Deb, 2006). Bunlardan en önemlisi enzimatik inaktivasyondur. Bunun önemi aminoglikozid modifiye eden enzim (AME) genlerinin plazmid ya da transpozonlar aracılığı ile yayılabilmesinden ileri gelmektedir (Ertek vd, 2003).

### **2.3.2.1. Bakteri membran geçirgenliğindeki azalmaya bağlı oluşan direnç**

Aminoglikozidlere karşı kromozomal mutasyon nedeniyle membran geçirgenliğinin azalması sonucu meydana gelen direnç düşük düzeydedir ve bütün aminoglikozidlere karşı çapraz direnç şeklindedir (Yıldırım, 2007). Pozitif yüklü aminoglikozidler, hücre içine aktif ve oksijene bağımlı transport sistemi ile girer (Yüce, 2001). Bakteri sitoplazma membranlarında aminoglikozidin hücre içine taşınmasını sağlayan özel aktif transport sistemi bozulur. Bu durumda ilaç molekülleri sitoplazma içindeki etki yerine (ribozomlara), yeterli miktarda ulaşamayacakları için antibakteriyel etkisi azalır veya kaybolur. Ancak bu direnç doğada yaygın değildir (Aslan, 2011). Oksijene bağımlı aktif transport sistemi anaeroblarda olmadığı için bu mikroorganizmalar aminoglikozidlere doğal dirençlidir (Yüce, 2001).

### **2.3.2.2. Ribozomal hedef değişiklikleri**

Bu direnç tipinde aminoglikozidlerin bağlandığı 30S ribozomal alt birimde yer alan S12 proteinindeki mutasyon sonucu ribozomal proteinlerdeki değişiklik streptomisin hedefe bağlanmasını engeller. Bu tür streptomisin direnci, enterokok izolatları arasında önemlidir. Ribozomal direnç gentamisin, tobramisin, amikasin gibi diğer aminoglikozidlerde daha nadir rastlanır (Yüce, 2001; Aslan, 2011). Bir ribozomal proteinde oluşan tek bir aminoasit değişikliği, o ribozomun antibiyotiğe karşı düşük afinite göstermesine neden olur (Oryaşın, 2008). Bu direnç tipi klinik olarak oldukça nadir görülmekte ve diğer aminoglikozidlere karşı çapraz direnç oluşmamaktadır (Yıldırım, 2007).

### **2.3.2.3. Enzimatik inaktivasyon**

Gram pozitif bakterilerde en sık karşılaşılan aminoglikozid direnç mekanizması AME kodlayan genlerin kazanımıdır (Hidalgo del Rio, 2013; Niu vd., 2016; Jaimee

ve Halami, 2016). Bu direnç şekli Gram negatif bakteri türlerinde de görülmektedir (Çiftçi ve Aşık, 2011). N-asetilasyon, O-fosforilasyon, O-nükleotidilasyon gibi önemli reaksiyonlardan sorumlu olan AME'lerin her biri için çeşitli enzim grupları vardır ve bu enzimler antibiyotik üzerindeki hidroksil grubunu fosforile etmek için ATP'yi kullanan fosfotransferazlar (aph), antibiyotik üzerindeki amino grubunu asetillemek için asetil-CoA'yı kullanan asetiltransferazlar (aac) ve antibiyotik üzerindeki hidroksil grubunu adenilize etmek için ATP'yi kullanan nükleotidiltransferazlar (ant)'dır (Mingeot-Leclercq vd., 1999; Yüce, 2001; Jana ve Deb, 2006; Avent vd., 2011; Hidalgo del Rio, 2013). AME, 2-deoksistreptamin çekirdeğinin veya şeker parçalarının -OH veya -NH<sub>2</sub> gruplarındaki modifikasyonunu katalize eder (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

AME'lerin ve bunları kodlayan genlerin çok sayıda olması, standartlaştırılmış bir isimlendirme gerektirmiştir. Bu enzimler için iki ana terminoloji vardır. En eski isimlendirme sistemi, genleri aac (*aac*'ler için), aad (*ant*'ler için) ve aph (*aph*'ler için) şeklinde ayırıp, aminoglikoziddeki modifikasyon alanını tanımlayan bir büyük harf (aacA, aminoglikozid 6'-N- anlamına gelir) ve ardından spesifik bir geni tanımlayan bir sayı eklenerek (yani aacA3) tanımlanır. Diğer isimlendirme sistemine göre ise aac, ant veya aph'den sonra, aileye atıfta bulunulur ve aktivite tipine bağlıdır, ardından parantezde (sınıf) modifikasyon alanı, direnç fenotipine (alt sınıf) atıfta bulunan bir romen rakamı ve belirli gen için bir küçük harften (yani aac (6')-Ia) oluşur (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013). Enzimatik modifikasyon, aminoglikozid direncinin en önemli mekanizmalarından biridir (Jana ve Deb, 2006). Enterokoklar; çeşitli AME genleri aracılığı ile aminoglikozidlere yüksek direnç geliştirmişlerdir (MİK değerleri genellikle  $\geq 2000 \mu\text{g/mL}$ ). Aminoglikozid-modifiye edici enzimleri kodlayan enterokoklarda bugüne kadar tespit edilen direnç genleri, Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Chow, 2000).

**Çizelge 2.2.** Aminoglikozid-modifiye edici enzimleri kodlayan enterokoklarda bugüne kadar tespit edilen direnç genleri (Chow, 2000)

Direnç genleri	Aminoglikozidler							
	Gentamisin	Tobramisin	Amikasin	Kanamisin	Netilmisin	Dibekasin	Streptomisin	Arbekasin
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	R	R	R	R	R	R	S	S <sup>a</sup>
<i>aph(2'')-Ib</i>	R	R	S	R	R	R	S	S
<i>aph(2'')-Ic</i>	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>aph(2'')-Id</i>	R	R	S	R	R	R	S	S
<i>aph(3')-IIIa</i>	S	S	R	R	S	S	S	S
<i>aac(6')-Ii</i>	S	R	S	R	R	NT	S	NT
<i>ant(3'')-Ia</i>	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>ant(4')-Ia</i>	S	R	R	R	S	NT	S	S
<i>ant(6')-Ia</i>	S	S	S	S	S	S	R	S

NT: test edilmemiştir, R: dirençli, S: duyarlı

<sup>a</sup> Suşların % 41'lik kısmı duyarlı olarak test edilmiştir

Yüksek seviyede aminoglikozid direnci; genellikle AME kodlayan bir mobil element ile kazanılmaktadır. Bu enzimleri kodlayan genler, yatay gen transferini kolaylaştıran mobil genetik elemanlar üzerinde bulunur. Bununla birlikte, bazı bakterilerde bu genler kromozomda kodludur. Örneğin *E. faecium* kromozomu, aac(6')-II enzimini kodlayan bir gen barındırır. Yüksek sayıda enzim, hızlı yayılımı ve sürekli gelişimi nedeniyle bu mekanizma klinik olarak önemli tüm bakteri türleri arasında yaygındır (Mingeot-Leclercq vd., 1999; Avent vd., 2011; Hidalgo del Rio, 2013). Bu enzimlerde korunan motiflerin tam biyokimyasal fonksiyonları daha detaylı yapısal çalışmalar ile henüz doğrulanmamıştır (Jana ve Deb, 2006). Çizelge 2.3'de yüksek seviyede aminoglikozid direncinin gelişmesine neden olan mekanizmalar görülmektedir.

**Çizelge 2.3.** Yüksek seviyede aminoglikozid direncinin gelişmesine neden olan mekanizmalar (Hoşgör, 1996)

<b>Antibiyotik</b>	<b>Mekanizma</b>
Streptomisin	Ribozomal direnç veya plazmid aracılı 3"- aad aktivitesi
Gentamisin	Plazmid aracılı 2"-aph-6'-aac veya 3'- aph aktivitesi
Kanamisin, Amikasin	Plazmid aracılı 3-aph aktivitesi
Kanamisin, Tobramisin	Plazmid aracılı 2"-aph-6'-aac aktivitesi

### 2.3.2.3.1. Aminoglikozid N-asetiltransferazlar (AAC'ler)

Aminoglikozid N-asetiltransferazlar (aac), hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunurlar ve genellikle çok geniş bir aminoglikozid direnç profili gösterirler. Bu aileye ait enzimler tipik aminoglikozidlerin dört amino grubundan (NH<sub>2</sub>) birinin asetil koenzim A'yı verici substrat olarak kullanarak N-asetilasyonunu (regioselektif asetilasyonunu) katalize eder. Asetilasyon, bu bileşiklerin 30S ribozomal alt ünitesindeki hedeflerine olan ilgisini azaltır. Aminoglikozidlerin asetilasyonu, hem asetil-CoA'nın hem de amino grubu aminoglikozidlerin enzime rastgele bağlanmasından sonra ortaya çıkar. Aac'ler, aminoglikozid yapısı üzerindeki asetil transferine özgü olarak sınıflandırılır. Dört üyesi olan asetiltransferaz sınıfının üç boyutlu yapısı çözülmüş, bunların ve bu enzimlerin diğer temsilcilerinin mekanik



ve yapısal yönleri ayrıntılı olarak incelenmiştir (Jana ve Deb, 2006; Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013). Bunlar, açıltransferazların GCN5 ile ilişkili N-asetiltransferazlar (GNAT) süper ailesi ile düşük aminoasit sekansı benzerliği ile karakterize olmakla birlikte ortak bir 3D yapıyı paylaşmaktadır. Böylece, aac'lerin aminoasit sekansları birbirinden farklı olsa da, bunlar asetil-CoA bağlanma cebi etrafında oluşturulan benzer 3D-katlanma modelleri oluştururlar (Jana ve Deb, 2006; Hidalgo del Rio, 2013). aac'lerin aminoglikozidlerin yanı sıra başka substratları da asetile ettiği bilinmektedir. Ayrıca, aac'lere aminoglikozid bağlanması sırasında su moleküllerine ihtiyaç olabilir. Bu durum, aac'lerin hücre içerisinde başka fonksiyonlarında olabileceğini ve aminoglikozidleri modifiye etme yeteneğini geliştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Birkaç yıl önce iki işlevli aac(6')-Ib-cr'nin bulunması, bu enzim ailesinin sürekli olarak gelişmekte olduğunu kanıtlar. Bu enzim, aac(6')-Ib'nin bir çeşidi olup, aynı zamanda fluorokinolonları da değiştirebilir. aac ailesi, aminoglikozid yapısı üzerinde asetil transferinin özgünlüğüne göre dört ana sınıfa ayrılır: aac(1), aac(3), aac(2') ve aac(6') (Hidalgo del Rio, 2013).

#### **2.3.2.3.1.1. AAC(1)**

aac(1) enzimlerinin substrat profili neomisin, ribostamisin, apramisin, butirosin, paromomisin ve lividomisin içerir. aac(1) enzimleri *E. coli*, *Campylobacter* spp. ve aktinomisetten izole edilmiştir (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

#### **2.3.2.3.1.2. AAC(3)**

Aminoglikozid asetiltransferazların (GNAT) en geniş sınıfıdır. Günümüze dek dokuz alt sınıf aac(3) enzimi tanımlanmış olup, hepsi Gram negatif bakterilerde tanımlanmıştır (Shaw vd., 1993; Jana ve Deb, 2006; Hidalgo del Rio, 2013). aac(3)-I alt sınıfı, çok sayıda *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram negatif klinik izolatlara gentamisin, sisomisin ve fortimisin (astromisin) direnci kazandıran beş enzim içerir (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013). Gram negatif bakteriler arasında yaygın olarak dağıtılan aac(3)-I(a-e) alt sınıfı içinde beş enzim tanımlanmıştır. Bunlar; fortimisin, sisomisin ve gentamisine direnç kazandırarak karakterize edilmiştir (Shaw vd., 1993; Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del

Rio, 2013). aac(3)-IIa, aac(3)-IIb, aac(3)-IIc, aac(3)-Va ve aac(3)-Vb enzimleri sırasıyla; *E. coli*, *Alcaligenes faecalis*, *Serratia marcescens*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bulunmuştur. aac(3)-III alt sınıfına ait üç enzim vardır ve hepsi *P. aeruginosa* izolatlarından izole edilmiştir. aac(3)-IV; *E.coli*, *Campylobacter jejuni* ve çevresel *Pseudomonas stutzeri* klinik suşlarında tanımlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

#### 2.3.2.3.1.3. AAC(2')

2'-amino grubunun asetilasyonunu katalize eden beş aminoglikozid asetiltransferaz vardır. Farklı *Mycobacterium* spp.'den aac(2')-Ia, aac(2')-Ib, aac(2')-Ic, aac(2')-Id ve aac(2')-Ie'den tanımlanmışken, aminoglikozid 2'-N-asetiltransferaz-Ia [aac(2')-Ia], ilk kez *Providencia stuartii*'de tanımlanmıştır (Franklin ve Clarke, 2001; Hidalgo del Rio, 2013). Gram negatiflerde ve *Mycobacterium*'da bulunan bu enzimler gentamisin, tobramisin, dibekasin, kanamisin ve netimisin gibi çeşitli aminoglikozidlerin modifikasyonuna aracılık eder. aac(2')-Ia (*P. stuartii*), aac(2')-Ib (*M. fortuitum* ve *Acinetobacter baumannii*) ve aac(2')-Ic (*M. tuberculosis* ve *M. bovis*) aac(2')-Id (*M. smegmatis*) ve aac(2')-Ie (*M. leprae*) içeren tek bir alt sınıf vardır. Bazı çalışmalar aac(2')-Ia genindeki bir mutasyonun, değişmiş seviyelere bağlı olarak hücre morfolojisindeki farklılıklara yol açtığını göstermiştir. Bu şekilde peptidoglikan O-asetilasyonu, aac(2')-Ia enziminin fizyolojik bir fonksiyonu olabilir. aac(2')-I'nin üç boyutlu yapısı, GCN5 ilişkili N-asetiltransferaz (GNAT) süper ailesine ait olduğunu doğrulamıştır. Bu enzimin aktivitesi, 2'-amino grubunu içeren aminoglikozidlerle en yüksektir. Bununla birlikte diğer asetiltransferazların aksine, aac(2')-Ic, 2'-hidroksil grubu içeren aminyakin ve kanamisin A'ya karşı aktiftir. Bu nedenle, bu enzim O-asetilasyonu katalize edebilir (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

#### 2.3.2.3.1.4. AAC(6')

aac(6') enzimleri Gram negatiflerde olduğu kadar Gram pozitiflerde de yaygındırlar. Bu enzimleri kodlayan genler, genellikle mobil genetik elementlerin bir parçasıdır ve plazmid ya da kromozomlar üzerinde bulunurlar (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Tüm *E. faecium* suşları aminoglikozid asetiltransferaz olan *aac(6')-Ii* geni tarafından

kodlanan *aac*-(6') enzimine sahiptir. Bu enzim aminoglikozid yapısındaki bir amino grubunun asetil CoA'ya bağımlı olarak asetilasyonuna yol açar. Böylece sitoplazmaya geçen ilaç inaktive edilir. Enzim; kanamisin, netilmisin, sisomisin, isepamisin ve tobramisinini modifiye eder. Ancak gentamisine etkisi yoktur (Chow, 2000; Oryaşın, 2008). Yaygın olarak bilindiği üzere, 6'-amino grubu aminoglikozidler, 30S ribozomal alt birim ve sonraki antibakteriyel aktiviteye bağlanmalarında önemli bir rol oynar (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Bu enzim sınıfına ait tanımlanmış çok sayıda genin var olmasının yanı sıra, kusursuz bir isimlendirme sisteminin olmaması nedeniyle, *aac*(6') enzimlerinin sınıflandırılması sırasında çeşitli hatalar meydana gelmektedir. Bileşik proteinin N veya C terminal bölgesi üzerinde yer alan *aac*(6') proteini olan *aac*(6') aktiviteleri içeren füzyon proteinlerinin varlığı bildirilmiştir. Bu kaynaşmış *aac*(6') genleri genellikle integronlar üzerinde bulunur ve bunlar integraraz aracılı rekombinasyon olaylarının bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

Bunlar arasında klinik açıdan en önemlisi bir AME olan; iki işlevli enzimi kodlayan *aac*(6')-*Ie-aph*(2'')-*Ia* genidir. *aac*(6')-*Ie-aph*(2'')-*Ia* geni bulunan enterokoklar; streptomisin dışında gentamisin, tobramisin, amikasin, kanamisin ve netilmisin gibi klinik açıdan mevcut hemen hemen tüm aminoglikozidlere karşı dirençlidirler (Vakulenko vd., 2003; Jana ve Deb, 2006; Jaimee ve Halami, 2016; Niu vd., 2016). MİK değeri >500 µg/mL olan yüksek seviyede gentamisin direnci ve yüksek seviyede kanamisin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bu çift işlevli gen, *Staphylococcus* ve *Enterococcus* spp. klinik suşları arasında oldukça yaygındır. Gram pozitif organizmalar arasındaki yaygın yayılımı, düşük oranda G+S içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Jaimee ve Halami, 2016). Bu enzim genleri yüksek seviyeli aminoglikozid direnci sağlar ve patojenik bakteriler arasında yaygın olarak bulunur. Enzimin yapısal geni genellikle transpoze edilebilir elementler üzerinde bulunur ve sıklıkla R plazmidleri üzerinde taşınır (Jana ve Deb, 2006).

#### **2.3.2.3.2. Aminoglikozid O-nükleotidiltransferazlar (ANT)**

Aminoglikozid O-nükleotidiltransferazlar (ant), aminoglikozid inaktive eden enzimlerin en küçük sınıfını oluşturmaktadır. Aminoglikozid molekülündeki ATP

grubunun ATP'den substrata ve hidroksil grubuna transferini katalize ederek aminoglikozidlerin inaktivasyonuna aracılık eder (Jana ve Deb, 2006; Ramirez ve Tolmasky, 2010).

Gentamisin ve tobramisin gibi klinik olarak önemli aminoglikozidler, ant(6) ile modifiye edilir. Bu enzimi kodlayan gen, patojenik bakteriler arasında yaygın olarak bulunur. Bugüne kadar, aminoglikozid molekülü üzerinde adenilasyon pozisyonuna bağlı olarak kategorize edilmiş ant(6), ant(9), ant(4'), ant(2'') ve ant(3'') olmak üzere beş ant sınıfı tanımlanmıştır. Bu enzimler, O-adenilatlanmış antibiyotik molekülünü oluşturmak için Mg-ATP ve aminoglikozidler arasındaki reaksiyonu katalize eder. Bunlar hem kromozom hem de plazmid kodlu enzimlerdir. Adeniltransferazları kodlayan *ant(2'')* ve *ant(3'')* genleri genellikle dirençli Gram negatif bakterilerde, *ant(4')*, *ant(6)* ve *ant(9)* genleri de Gram pozitif organizmalarda görülmektedir. En yaygın bulunan ant'lar ant(3'') enzimlerdir (Jana ve Deb, 2006; Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

Yapısal olarak en kapsamlı incelenen ve ant(2'') ile ant(4') tarafından katalize edilen reaksiyonlar en önemlileridir. Tüm enzimin 3 boyutlu yapısı zor olmasına rağmen, aminoglikozid substratlarının enzime bağlı yapısı nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bu enzim ailesinin klinik açıdan en önemli üyelerinden biri, ant(2'')-Ia'dır. Çünkü Kuzey Amerika'da gentamisin direncinin oldukça önemli bir nedeni olup, Gram negatif patojenler arasında yaygındır. Gentamisin, kanamisin, tobramisin, sisomisin ve dibekasine direnç kazandırır. Tipik olarak *Staphylococcus* ve *Enterococcus*'un plazmidlerinde bulunan *ant(4')-Ia*, üç boyutlu yapısı bilinen tek ant genidir (Jana ve Deb, 2006; Hidalgo del Rio, 2013).

#### **2.3.2.3.2.1. ANT(6)**

*ant(6)* genleri Gram pozitif bakteriler arasında oldukça yaygındır. ant enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde; transpozonlarda ve kromozomlarda bulunur. *ant(6)* geni, aminoglikozidlere (streptomisin) karşı direnci belirleyen bir dizi olan *ant(6)-sat4-af(3')-II* üzerinde bulunur (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

#### 2.3.2.3.2.2. ANT (9)

ant(9)-Ia ve ant(9)-Ib olmak üzere iki enzim tanımlanmıştır. Bu iki enzimde spektinomisine karşı dirençten sorumludur. Bu enzimleri kodlayan genler, *ant(9)-Ia* ve *ant(9)-Ib* şeklinde adlandırılıyorken, karışıklığı gidermek için *spc* veya *aad(9)* tanımlaması yapılmıştır. ant(9)-Ia ve ant(9)-Ib aminoasit dizileri % 39 oranında benzerlik göstermektedir. ant(9)-Ia önce *S. aureus*'da ve daha sonra *E. avium*, *E. faecium* ve *E. faecalis*'de tanımlanmıştır. Dört bakteri geninin tamamı Tn554 transpozonunun bir parçasıdır. ant(9)-Ib ise *E. faecalis*'de tanımlanmıştır (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

#### 2.3.2.3.2.3. ANT(4')

Aminoglikozid nükleotidiltransferaz olan ant(4')-Ia'yı kodlayan *ant(4')-Ia* geni, tobramisin, amikasin ve kanamisinine karşı direnç gösterir (Chow, 2000). *ant(4')-Ia* geni, *Staphylococcus*, *Enterococcus* ve *Bacillus* spp. gibi Gram pozitif bakterilerde bulunur ve plazmidler üzerinde taşınır. Bu genler aynı zamanda *aadD*, *aadD2* ve *ant(4', 4'')-I* olarak da bilinmektedir (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

#### 2.3.2.3.2.4. ANT(2'')

*ant(2'')* genleri genellikle plazmidler ve transpozonlar tarafından kodlanır. Daha yaygın olarak *aadB* adı verilen bir gen tarafından kodlanan bu enzim, enterokoklarda ve fermentasyon dışı Gram negatif basillerde bulunur. ant(2'')-Ia, gentamisin, tobramisin, dibekasin, sisomisin ve kanamisin direncine aracılık eden bir enzimdir (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

#### 2.3.2.3.2.5. ANT(3'')

*ant(3'')*'ler en yaygın bulunan ant enzimleridir. Spektinomisin ve streptomisine dirençlidir ve bu enzimleri kodlayan genler yaygın olarak *aadA* olarak adlandırılır. GenBank'ta *aadA1*'den *aadA24*'e kadar tanımlanan en az 22 yüksek oranda ilgili gen versiyonu bulunur. *aadA1* tarafından kodlanan protein için alternatif terminoloji *ant(3'')-Ia*'dır. *ant(3'')-Ia*'yı tanımlamak için kullanılan başka bir isim *aad(3'')*'dir.

*aadA* genleri gen kasetleri olarak bulunur ve çok sayıda integron, plazmid ve transpozonun bir parçasıdır (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

### **2.3.2.3.3. Aminoglikozid-O-fosfotransferazlar (APH)**

Bu enzimler, bakteriyel patojenler arasında yaygın olarak bulunurlar ve genellikle plazmid ve transpozonlar üzerinde yer alan genler tarafından kodlanırlar. Bu aile, Gram pozitif bakterilerde görülürler (Vakulenko ve Mobashery, 2003). *aph*'ler, fosforil transferinin özgünlüğüne, substrat spesifitesine ve söz konusu spesifik gen dizisine göre sınıflandırılır. *Aph*'ler, ATP'nin  $\gamma$ -fosforil grubunun, aminoglikozid üzerinde mevcut olan hidroksil ikame edicilerinden birine yeniden transferini katalize eder, ökaryotlarda bulunan kinazlara yakın bir benzerlik göstermesi nedeni ile "aminoglikozid kinazlar" olarak da adlandırılırlar (Wright ve Thompson, 1999; Jana ve Deb, 2006; Hidalgo del Rio, 2013). Sınıflar ve alt sınıflar şunlardır: *aph(4)*-, *aph(6)*-, *aph(9)*-, *aph(3')*-, *aph(2'')*-, *aph(3'')*-, *aph(7'')*-'dir (Ramirez ve Tolmasky, 2010). *aph*'ler içindeki sınıflar ve alt sınıflardan sadece *aph(3')* enzimleri, *aph*'lerin en kapsamlı ve en iyi çalışılan sınıfıdır (Hidalgo del Rio, 2013). Tek fonksiyonlu AME kodlayan *aph(2'')*-*Ib*, *aph(2'')*-*Ic* ve *aph(2'')*-*Id* genleri yüksek seviyede gentamisin, *aph(3')*-*IIIa*, *ant(4')*-*Ia* ve *ant(6')*-*Ia* genleri ise gentamisin dışındaki çeşitli aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur (Vakulenko vd., 2003; Jaimee ve Halami, 2016; Niu vd., 2016).

#### **2.3.2.3.3.1. APH(4)**

*aph(4)* grubunda tanımlanan tek alt sınıf içinde iki enzim bulunur. Bunlar sırasıyla *hph* ve *hyg* genleri olarak adlandırılan *aph(4)*-*Ia* ve *aph(4)*-*Ib*'dir. Bu enzimler, higromisine karşı direnç gösterirler (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

#### **2.3.2.3.3.2. APH(6)**

Streptomisine direnç kazandıran *aph(6)* alt sınıfında 4 enzim vardır. *aphD* ve *strA* olarak da bilinen *aph(6)*-*Ia*, başlangıçta *Streptomyces griseus*'un kromozomunda, *sph* olarak bilinen *aph(6)*-*Ib* ise *Streptomyces glaucescens*'de tanımlanmıştır. *aph(6)*-*Ic*, Gram negatiflerde bulunan kompozit bir transpozon olan Tn5 üzerinde

kodlanan üç direnç geninden biridir. *strB* ve *orfI* olarak da adlandırılan *aph(6)-Id* geni, ilk olarak 8.684 bp'lik RSF1010 plazmidinde bulunmuştur. Gram negatif bakteriler, Gram pozitif bakteriler ve aktinomisetlerden izole edilmektedir (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

### 2.3.2.3.3.3. APH(9)

*aph(9)-Ia* geni ilk olarak *Legionella pneumophila*'da bulunmuştur. *aph(9)-Ib* geni ise *Streptomyces flavopersicus*'tan (*Str. netropsis*) izole edilmiştir ve *SpcN* adı da verilmektedir (Ramirez ve Tolmasky, 2010).

### 2.3.2.3.3.4. APH(3')

APH(3') ailesi üyeleri yaygın olarak gözlenmekte ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak direnç işareti olarak kullanılmaktadır. En çok çalışılan *aph*, hem 3' ve 5'- regiospesifik fosforil transfer kapasitelerine sahip olan *aph(3')-IIIa*'dır. Enzim temel olarak stafilokok ve enterokok gibi Gram pozitif koklarda bulunur (Jana ve Deb, 2006; Hidalgo del Rio, 2013). *aph(3')-I* alt sınıfı, kanamisin, neomisin, paromomisin, ribostamisin, lividomisin içeren bir direnç profilini gösterir ve geniş konakçı aralığında plazmidler ve transpozonlar üzerinde kodlu ağırlıklı olarak Gram negatifler arasında yaygın olarak bulunan üç enzimden oluşur (Vakulenko ve Mobashery, 2003). *aph(3')-Ia* geni, aynı zamanda *aphA-I* olarak da bilinir ve Tn903 transpozonunun bir parçasıdır. Genellikle klonlama araçlarında işaretleyici gen olarak kullanılır. *aph(3')-Ib* geni, konjugatif RP4 plazmidinin geniş konakçı aralığının bir parçasıdır. Bu gen başlangıçta *aphA* olarak adlandırılmıştır. *aph(3')-Ic* geni aynı zamanda *aphA7* ve *aphA1-Iab* olarak da adlandırılmaktadır (Ramirez ve Tolmasky, 2010). *aph(3')-II* alt sınıfından; *aph(3')-IIa* *S. aeruginosa* kromozomunda, *aph(3')-IIb* geni *P. aeruginosa* kromozomunda tanımlanmıştır. Bu alt sınıfın üçüncü üyesi olan *aph(3')-IIc* son zamanlarda *S. maltophilia* kromozomunda tanımlanmıştır (Okazaki ve Avison, 2007; Hidalgo del Rio, 2013). *aph*'lerin en çok çalışılan üyesi, genellikle Gram pozitif patojenlerde bulunan *aph(3')-IIIa*'dır (Hidalgo del Rio, 2013). *aph(3')-IIIa* geni; kanamisine karşı yüksek düzeyde dirence sahip aminoglikozid fosfotransferazı olan *aph(3')-IIIa*'yı kodlar (Chow, 2000). *aph(3')-IIIa*, kanamisin, neomisin, lividomisin,

paromomisin, livostamisin, butirosin, amikasin ve izepamisin olmak üzere geniş bir aminoglikozid aralığına direnç kazandırır (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013). Ökaryotik kinazlar gibi, üç boyutlu yapısı ATP bağlamasından sorumlu bir N-terminali  $\beta$ -yaprak bölgesi ve aminoglikozid tanıma bölgesi olarak işlev gören C terminal'de bir  $\alpha$ -sarmal olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır (Hidalgo del Rio, 2013). *aph(3')-IV*, butirosin üreticisi *Bacillus circulans*'tan klonlanmıştır. *aph(3')-Va*, *aph(3')-Vb* ve *aph(3')-Vc* genleri aktinomisetlerin kromozomunda bulunur (Wright ve Thompson, 1999). Bu alt sınıfın direnç profili, neomisin, paromomisin ve ribostamisin içerir. *aphA-6* olarak da bilinen *aph(3')-VIa*, *Acinetobacter baumannii*'de, *aph(3')-VIb*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Serratia marcescens*'de tanımlanmıştır. *aphA-7* olarak da bilinen *aph(3')-VIIa*, *Campylobacter jejuni*'de tanımlanmıştır. Kanamisin ve neomisin direncinden sorumludur (Ramirez ve Tolmasky, 2010; Hidalgo del Rio, 2013).

#### **2.3.2.3.3.5. APH(2'')**

Gram pozitif bakterilerde görülen gentamisin direncinde *aph(2'')* geni önemli bir rol oynamaktadır (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Yeni aminoglikozid direnç genleri olan *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* veya *aph(2'')-Id*'nin yaygınlığının tespiti amacıyla yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Chow, 2000). Bu enzimler; direnç profilleri, bölgesel spesifiklikleri ve verici substrat tercihleri üzerine etkileri ve *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* tarafından sunulan aminoglikozid alıcı alt tabaka profillerine dayanarak yeniden sınıflandırmışlardır. Bu enzimlerin yeniden adlandırılmasının sebebi, verici substratın bir kriter olarak dahil edilmesidir. Dolayısıyla, en azından 2 sınıfının fosfotransferazları durumunda, alt sınıf isimlendirmesi şimdi alıcının yanı sıra verici substrat profilini de göz önüne alır. Sonuç olarak, APH'nin isimlerinin değiştirilmesi önerilmiştir; (2'')-Ib, -Ic ve -Id, sırasıyla *aph(2'')-IIa*, -IIIa ve IVa'ya dönüştürülmüştür. Bu enzimlerin üç boyutlu yapıları çözülmüştür (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Enterokoklarda gentamisine karşı yüksek düzeyde direnci kodladığı tespit edilen en son gen, *aph(2'')-Ib*'dir. Bu gen, aynı zamanda enterokoklarda tobramisin, kanamisin, netilmisin ve dibekasine karşı yüksek düzeyde direnç gelişmesinde de rol oynamaktadır. Bununla birlikte bugüne kadar *aph(2'')-Ib* içerdiği tespit edilen *E. faecium* izolatlarının tamamının, aynı zamanda amikasinine karşı da dirençli oldukları tespit edilmiştir (MİK  $\geq$ 512



$\mu\text{g/mL}$ ). Bu direnç, muhtemelen amikasin direncini kodlayan ayrı bir aminoglikozid direnç geninin varlığından kaynaklanmaktadır. *aph(2'')-Ic* geni, ilk olarak *E. gallinarium* hayvan izolatından tanımlansada daha sonra *E. faecium* ve *E. faecalis* klinik izolatlarında da tespit edilmiştir. Gentamisinin MİK oranı, *aph(2'')-Ic* içeren enterokoklar için 256-384  $\mu\text{g/mL}$  olmasına rağmen, bu izolatlar ampisilin-gentamisin sinerjizmine dayanıklı değildirler (Chow, 2000). Enterokoklarda yakın zaman içinde tespit edilen bir diğer yeni gentamisine karşı dirençli gen ise *aph(2'')-Id*'dir. Bu gen ilk olarak *E. casseliflavus* kan izolatında tanımlanmıştır. Klinik izolatlar arasında daha sonra yapılan incelemelerde *aph(2'')-Id* tespitlerinin tamamı, vankomisine dirençli *E. faecium*'da yapılmıştır. *aph(2'')-Id* geni, bir aminoglikozid fosfotransferazı olan *aph(2'')-Id*'yi kodlamakta ve bu da gentamisin, tobramisin, kanamisin, netilmisin ve dibekasinde dönüşüme yol açmaktadır. *aph(2'')-Id* içeren bu 5 aminoglikozidin MİK'lerinin tamamı  $\geq 2000 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Sadece *aph(2'')-Id* içeren enterokokların, ampisilin-amikasin sinerjisine hassas olduğu düşünülmektedir (Chow, 2000).

#### **2.3.2.3.3.6. APH(3'')**

*aph(3'')* enzimlerinin tek alt sınıfı streptomisine direnç gösterir. *aph(3'')-Ia* ve *Ic* genleri, sırasıyla *S. griseus* ve *M. fortuitum*'un kromozomlarından izole edilmiştir (Ramon-Garcia vd, 2006).

#### **2.3.2.3.3.7. APH(7'')**

Higromisin direncine aracılık eden *aph(7'')-Ia* *Streptomyces hygrosopicus*'dan izole edilmiştir (Berthold vd., 2002).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Süt ve süt ürünleri**

Tez çalışması kapsamında biyomateryal olarak kullanılan yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel *Enterococcus* türlerinin izolasyonu için 2017 yılı Şubat - Temmuz aylarını kapsayan altı aylık süre boyunca belirli aralıklarla Isparta ve Antalya ilinde bulunan yerel üretici ve geleneksel ürün satılan market ve pazarlardan temin edilen toplam 100 çiğ süt (10) ve süt ürünleri (70 peynir, 10 tereyağı ve 10 yoğurt) örnekleri kullanılmıştır.

##### **3.1.2. Mikroorganizmalar**

Araştırma kapsamında toplam 59 YSAD muhtemel *Enterococcus* suşu izole edilmiştir. İzole edilen enterokok suşları; de Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS, LAB M, Lancashire, İngiltere) besiyeri ortamına % 20 oranında steril gliserol (Riedel-de Haën, Seelze, Almanya) ilave edilerek stok tüplerinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışma materyalleri ise gliserol ilave edilmemiş MRS broth besiyeri ortamında +4 °C'de ve haftalık transferler yapılarak muhafaza edilmiştir.

#### **3.2. Yöntem**

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

YSAD muhtemel *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için her bir süt ve süt ürünü örneğinden aseptik koşullar altında 10 mL veya 10 g numune alınmış ve 90 mL fizyolojik tuzlu su çözeltisi (FTS, % 0.85 NaCl, w/v) ile yüksek hızda karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan örnek dilüsyonlarından mikropipet yardımıyla 100'er mL alınmış ve yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için 500 µg/mL gentamisin, yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için ise 2000 µg/mL

streptomisin ilave edilerek hazırlanan Enterococcosel agar (Becton Dickinson, Almanya) ve MRS agar (LAB M) besiyeri ortamlarına Drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. Petri kutuları 37 °C'de 2-5 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda Enterococcosel agar ortamında etrafında siyah renkte zon veren ve MRS agar ortamında ise gelişme gösteren her bir koloni YSGD/YSSD muhtemel *Enterococcus* izolatu olarak düşünülmüş ve çalışma materyali olarak öze yardımı ile alınarak izole edildikleri konsantrasyonda gentamisin veya streptomisin ilave edilen içeren MRS broth besiyeri ortamlarında kültüre edilmiştir. Seçilen izolatların saflık kontrolü Enterococcosel agar ortamında yapılmıştır.

### **3.2.2. YSAD izolatların cins düzeyinde tanısı**

#### **3.2.2.1. Morfolojik tanı ve katalaz testi**

YSAD izolatların mikroskopik morfolojileri Gram boyama yöntemiyle hazırlanan preparatların 1000 X büyütme ile ışık mikroskopunda (Leica DM500, Almanya) incelenmesi sonucunda tespit edilmiştir. Katalaz testi için Enterococcosel agar ortamında geliştirilen bakteri kolonileri lam üzerine aktarılmış ve üzerine bir damla % 3 derişimde hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltilisinden damlatılmıştır. Gaz çıkışı olup olmadığı izlenmiştir. Gaz çıkışı gözlenmeyen örnekler katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Denemelerde *S. aureus* ATCC 25923 pozitif ve *E. faecalis* ATCC 29212 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.2.2. MRS broth ortamında gelişme**

MRS broth ortamında gelişme özelliklerinin belirlenmesi için 37 °C'de 18 saat kültüre edilen izolatlar, % 6.5 NaCl (w/v) içeren ve pH'sı 9.6'ya ayarlanmış iki farklı MRS broth besiyeri ortamına inoküle edilmiştir. 37 °C'de 18 saatlik inkübasyonun ardından tüplerde mikrobiyal gelişme kontrol edilmiştir (Manero ve Blanch, 1999). İzolatların 10 °C ve 45 °C'de gelişme özellikleri ve 60 °C'de 30 dk sıcaklık uygulamasına karşı ısıl dirençleri MRS broth ortamında test edilmiştir (Morandi vd., 2006).

### 3.2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile cins düzeyinde tanı

#### 3.2.2.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için YSAD izolatlar MRS broth ortamında 37 °C’de 18 saat süre ile geliştirilmiş ve inkübasyon süresi sonunda kültürlerden mikropipet yardımıyla steril Eppendorf tüplerine 0.5 mL aktarılmıştır. Hücrelerin çöktürülmesi için tüpler 13000 rpm devirde 5 dk santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından üst fazlar dökülmüş ve hücre çökeltileri üzerine 0.5 mL liziz çözeltisi ilave edilerek tüp karıştırıcıda (Velp Scientificial, Wizard X, İtalya) çözülmüştür. Daha sonra tüpler su banyosu (Nüve NB 9, Türkiye) içerisinde 37 °C’de 30 dk süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, Serva, Heidelberg, Almanya, % 10 w/v) ilave edilmiş ve 80 °C’ye ayarlanmış su banyosunda (Nüve NB 9, Türkiye) 10 dk tutulmuştur. İnkübasyon sonrası lize olan hücre süspansiyonları üzerine 0.7 mL fenol-kloroform (1:10, v/v) ilave edilerek 13000 rpm devirde 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj işlemini takiben mikropipet yardımıyla üst fazlar alınarak yeni steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerine -20 °C’de saklanan 0.7 mL 2-propanol (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edilmiştir. Tüpler bir kez daha 13000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan çökelti 50 µL Tris EDTA tamponu (pH 8.0) içerisinde çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir (Cancilla vd., 1992).

#### **Liziz Çözeltisi**

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

#### **SDS (%10)**

SDS	10	g
Destile su	100	mL

### **Tris-EDTA**

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

### **3.2.2.3.2. Genomik DNA örneklerinin elektroforezi**

YSAD suşlardan izole edilen genomik DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile % 0.7 (w/v) oranında agaroz (AppliChem GmbH., Darmstadt, Almanya) içeren jellerde kontrol edilmiştir. Bu amaçla agaroz 150 mL tris asetat tampon içerisinde hazırlanmış ve mikrodalga fırında (Arçelik MD 565 S, Türkiye) çözülmüştür. Jel oda sıcaklığına soğutulduktan sonra yatay elektroforez jel sistemine (Thermo Fisher Scientific OWL EASYCAST B2, Amerika Birleşik Devletleri) dökülmüştür. Daha sonra tanka jel tarağı yerleştirilmiş ve polimerizasyon için 30-45 dk beklenmiştir. Jelin polimerizasyonunu takiben taraklar jele zarar vermeden ortamdan uzaklaştırılmış ve jelin üzerini kapatacak biçimde elektroforez tankına tris-asetat tampon çözeltisi ilave edilmiştir. 10 µL genomik DNA örneği, 2 µL marker boya ile karıştırılmış ve mikropipet yardımıyla örneğin tamamı kuyulara yüklenmiştir. Elektroforez işleminde moleküler belirteç olarak O'GeneRuler™ 1 kb DNA marker (Fermentas #SM1163, Litvanya) kullanılmıştır. Elektroforez 85 voltta 1.5-2 saat süre ile yapılmış ve elektroforez işleminin ardından jeller 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, ABD) çözeltisi içerisine aktarılarak 30 dk süre ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra jeller 312 nm dalga boyunda UV ışık (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) altında incelenmiş ve jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D5100 (Nikon Corp., Japonya) dijital fotoğraf makinesi kullanılmıştır.

### **Tris-Asetat Tamponu (1X)**

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

### Marker Boya

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

### 3.2.2.3.3. İzolatların cinse özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı

YSAD izolatların *Enterococcus* cinsine özgü primer (Ent 1: TACTGACAAACCATTCATGATG ve Ent 2: AACTTCGTCACCAACGCGAAC) ile cins düzeyinde tanısı TurboCyler 2 gradient termal döngü cihazı (Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) kullanılarak yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) denemelerinde Çizelge 3.1’de verilen karışım kullanılarak Sahoo vd. (2015), tarafından önerilen protokole göre yapılmıştır.

**Çizelge 3.1.** Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan PZR karışımı

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

### PZR protokolü

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

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin elektroforezi OWL EASYCAST B2 yatay elektroforez tankında % 2 (w/v) oranında agaroz içeren jellerde 85 voltta 1.5-2 saat

süre ile yapılmış ve fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo Fisher Scientific #SM1153, ABD) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. Jeller 3.2.2.3.2. nolu başlıkta belirtilen şekilde etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, ABD) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır.

### 3.2.3. YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısı

#### 3.2.3.1. Türe özgü primerler ile tür düzeyinde tanı

YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında fermente süt ve süt ürünlerinden sıklıkla izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii* türlerine özgü primer setleri kullanılmıştır (Jackson vd., 2004). *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında kullanılan primer dizileri ve ürün büyüklükleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. PZR işlemi Çizelge 3.1'de verilen PZR karışımı kullanılarak *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. hirae* türlerinin tespiti için protokol 1'e ve *E. mundtii* türünün tespiti için protokol 2'ye göre yapılmıştır.

**Çizelge 3. 2.** *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri

Tür	Primer dizisi (5' - 3')	Ürün boyutu (bp)
<i>E. casseliflavus</i>	TCCTGAATTAGGTGAAAAAC GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	288
<i>E. durans</i>	CCTACTGATATTAAGACAGCG TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295
<i>E. faecalis</i>	ACTTATGTGACTAACTTAACC TAATGGTGAATCTTGTTTGG	360
<i>E. faecium</i>	GAAAAACAATAGAAGAATTAT TGCTTTTTTGAATTCCTTTA	215
<i>E. gallinarum</i>	TTACTTGCTGATTTTGATTTCG TGAATTCCTTTGAAATCAG	173
<i>E. hirae</i>	CTTTCTGATATGGATGCTGTC TAAATTCCTTAAATGTTG	187
<i>E. mundtii</i>	CAGACATGGATGCTATCCATCT GCCATGATTTCCAGAAGAAT	98

Protokol 1 (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. hirae* için)

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

Protokol 2 (*E. mundtii* için)

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

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde gerçekleştirilmiştir. Jeller etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo Fisher Scientific #SM1153) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır.

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

Türe özgü primerler yardımıyla tür düzeyinde tanısı yapılamamış olan 8 YSAD *Enterococcus* izolatı (RS21.3, RS25.3, RS29.1, RG7.1, RG22.4, RG26.1, RG26.2 ve RG26.3) arasından peynir örneklerinden izole edilen 7 suşun tür düzeyinde tanısı Prof. Dr. Yasin TUNCER danışmanlığında yürütülen Degnide Ephrem Adifon tarafından tamamlanan ve bu tez kapsamında izole edilen suşların kullanıldığı “Peynirden İzole Edilen Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) Enterokoklarda Virülens Faktörlerin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması” isimli yüksek lisans tezi kapsamında 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Çiğ süt örneğinden izole edilen RG7.1 suşu ise 16S rDNA dizi analizi



ile bu tez kapsamında tür düzeyinde tanımlanmıştır. RG7.1 izolatının 16S rDNA bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında Edwards vd. (1989) tarafından önerilen pA' (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' genel bakteri primerleri kullanılmıştır. PZR işlemi Çizelge 3.1'de verilen PZR karışımı kullanılarak aşağıda belirtilen protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### PZR protokolü

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

Çoğaltılan 16S rDNA PZR fragmentinin elektroforezi % 1 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jelde yapılmış ve fragment büyüklüğü O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo Fisher Scientific #SM1153) kullanılarak hesaplanmıştır. PZR ürününün DNA dizi analizi Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. (ODTÜ, Teknokent, Ankara, Türkiye)'inde yaptırılmıştır. Sekans işleminde Applied Biosystems® AB 3730XL (Thermo Fisher Scientific, ABD) otomatik gen sekans cihazı kullanılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

#### **3.2.4. YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi**

YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. MRS broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat geliştirilen *Enterococcus* kültürlerinden 2'şer mL alınarak steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve tüpler 13000 rpm devirde 5 dk santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No:12148) edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından üst faz dökülmüş ve kalan çökelti 1 mL fosfat tampon (PBS) ile yıkanmış ve 13000 rpm devirde 5 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama ve santrifüj işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Santrifüj işleminin

ardından oluşan üst faz dökülmüş ve çökelti tekrar 1 mL PBS içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan hücre süspansiyonlarının yoğunluğu PBS kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklık standardına ayarlanmıştır. Standardize edilen hücre süspansiyonlarından 150 mL alınarak Mueller Hinton agar (Biomark Laboratories, Hindistan) besiyerine yayılmış ve üzerlerine Oxoid Ltd. (İngiltere) firmasından temin edilen ampisilin (10 µg), penisilin G (10 U), vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), doksisiklin (30 µg), minosiklin (30 µg), norfloksasin (10 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), nitrofurantoin (300 µg), rifampin (5 µg), kloramfenikol (30 µg), quinupristin/dalfopristin (15 µg) ve linezolid (30 µg) içeren antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Bu işlemin ardından petri kutuları 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çapları kumpas yardımıyla ölçülmüştür (Cariolato vd., 2008). Enterokok suşlarının antibiyotik direnci ve duyarlılığı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2016 yılı klavuzuna göre değerlendirilmiştir.

#### **Fosfat Tampon (PBS)**

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

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

İzolatların streptomisin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Gentamisin ve streptomisin stok antibiyotik çözeltileri 96 kuyucuklu steril polistren mikrotitre tabaklarda (LP Italiano L120138, İtalya) Brain Heart Infusion broth (BHI, LAB 049, UK) besiyeri aracılığı ile 2 kat seyreltme işlemi uygulanarak 0.125-4096 µg/mL konsantrasyon aralığında dilüe edilmiştir. Daha sonra dilüe antibiyotikli besiyeri içeren kuyucuklara BHI broth besiyeri ortamında ardışık 2 pasaj yapılarak aktifleştirilen ve BHI broth besiyeri ortamı ile 1:10 oranında dilüe

edilen test kültüründen 5'er µL inoküle edilmiştir. Kültür inokülasyonunu takiben mikrotitre tabaklar 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Denemelerde kültür gelişimini gözlemlemek amacıyla antibiyotik ilave edilmemiş BHI broth besiyeri bulunan kuyucuklar kontrol olarak kullanılmıştır. MİK testinde *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 51559 ve *E. faecalis* ATCC 51299 suşları referans kültür olarak kullanılmıştır. Enterokok suşlarının MİK değerleri CLSI'nin 2016 ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)'nin 2018 yılı klavuzlarına göre değerlendirilmiştir.

### **3.2.6. YSAD *Enterococcus* izolatlarının aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) genlerinin varlığının PZR ile araştırılması**

YSAD *Enterococcus* izolatlarında yüksek seviyede gentamisin ve streptomisin direncine neden olan aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) genlerinin varlığının PZR ile tespitinde Çizelge 3.3'de verilen primer setleri kullanılmıştır. İzolatlarda yüksek seviyede streptomisin direnci ile ilişkili *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genlerinin ve yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genlerinin varlığı araştırılmıştır (Vakulenko vd., 2003; Niu vd., 2016). PZR uygulamalarında daha önce belirtilen yöntemle (3.2.2.3.1.) izole edilen genomik DNA örnekleri kalıp olarak kullanılmıştır. PZR işlemi Çizelge 3.1'de verilen toplam 50 µL PZR karışımı kullanılarak (Turbo Cycler 2 gradient termal döngü cihazında) gerçekleştirilmiştir. PZR denemelerinde *aph(3')-IIIa* ve *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genlerinin tespiti için protokol 1 (Vakulenko vd., 2003) ve *ant(6')-Ia* geninin tespiti için protokol 2 (Niu vd., 2016) kullanılmıştır.

Protokol 1 (*aph(3')-IIIa* ve *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri için)

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

Protokol 2 (*ant(6')-Ia* geni için)

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

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış, etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. PZR fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo Fisher Scientific #SM1153) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır.

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

Antibiyotik	Gen	Primer sekansı (5'-3')	Kaynaklar
Streptomisin	<i>aph(3')-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	Vakulenko vd., 2003
	<i>ant(4')-Ia</i>	CAAACCTGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	Vakulenko vd., 2003
	<i>ant(6')-Ia</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCCGCCACCTCACCG	Niu vd., 2016
Gentamisin	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	Vakulenko vd., 2003
	<i>aph(2'')-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	Vakulenko vd., 2003
	<i>aph(2'')-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	Vakulenko vd., 2003
	<i>aph(2'')-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	Vakulenko vd., 2003

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

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

Tez çalışması kapsamında kullanılan yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) muhtemel *Enterococcus* suşları; Antalya ve Isparta illerinde bulunan yerel üretici ve geleneksel ürün satılan market ve pazarlardan temin edilen toplam 100 çiğ süt ve süt ürünleri örneklerinden izole edilmiştir. Yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için 500 µg/mL gentamisin, yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD) *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için ise 2000 µg/mL streptomisin ilave edilerek hazırlanan Enterococcosel agar ve MRS agar besiyeri ortamları kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda (37 °C'de 2-5 gün) Enterococcosel agar ortamında etrafında siyah renkte zon veren ve MRS agar ortamında ise gelişme gösteren toplam 59 koloni YSGD/YSSD (20/39) muhtemel *Enterococcus* izolatu olarak düşünülmüş ve çalışma materyali olarak seçilmiştir. Daha sonra seçilen muhtemel enterokok kolonileri izole edildikleri konsantrasyonda gentamisin veya streptomisin ilave edilen MRS broth besiyeri ortamlarında kültüre edilmiş ve saflık kontrollerini takiben stok kültürleri hazırlanmıştır. Çalışma kapsamında YSAD muhtemel *Enterococcus* varlığının araştırıldığı örnek grupları içerisinde yalnız çiğ süt ve peynir örneklerinde YSAD muhtemel *Enterococcus* varlığına rastlanılmıştır. İzolasyon materyali olarak kullanılan hiçbir yoğurt ve tereyağı örneğinde koloni gelişimi gözlenmemiştir. İzole edilen toplam 59 YSAD muhtemel *Enterococcus* suşunun 54'ü (% 91.53) peynir örneklerinden izole edilmiştir. Söz konusu izolatların 15'i YSGD ve 39'u ise YSSD dir. Tez kapsamında kullanılan 70 peynir örneğinin sadece 22'sinde koloni gelişimi gözlenmiştir. Peynir örneklerinde YSAD muhtemel *Enterococcus* izolasyon sıklığı % 31.43 (22/70) olarak hesaplanmıştır. Geri kalan 5 YSAD muhtemel *Enterococcus* kolonisi ise incelenen 2 çiğ süt örneğinden izole edilmiştir. Çiğ süt örneklerinde YSAD muhtemel *Enterococcus* izolasyon sıklığı % 20 (2/10) olarak bulunmuştur. Çiğ süt izolatlarının tamamı YSGD dir. Çalışma kapsamında kullanılan YSAD muhtemel *Enterococcus* suşlarının izolasyon kaynakları, örneklerin temin edildiği iller ve izolat kodları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** YSAD muhtemel *Enterococcus* suşlarının izolasyon kaynakları, örneklerin temin edildiği iller ve izolat kodları

<b>İzolasyon kaynağı</b>	<b>Örneğin temin edildiği il</b>	<b>İzolat kodu*</b>
Beyaz peynir	Antalya	RS21.1, RS21.2
Tulum peyniri	Isparta	RS25.1, RS25.2, RS25.3, RS25.4, RS25.5
Beyaz Peynir	Isparta	RS27.1, RS27.2, RS27.3, RS27.4, RS27.5, RS27.6
Kaynamış inek peyniri	Isparta	RS29.1
Bergama inek peyniri	Isparta	RS32.1, RS32.2, RS32.3, RS32.4
Keçi deri peyniri	Isparta	RG36.1, RS36.1, RS36.2, RS36.3
Beyaz peynir	Isparta	RS42.1, RS42.2, RS42.3
Yalvaç beyaz peynir	Isparta	RG46.1, RG46.2, RS46.1, RS46.2, RS46.3
Kayseri tulum peyniri	Isparta	RS50.1
Beyaz peynir	Isparta	RG52.1, RG52.2
Beyaz peynir	Isparta	RG53.1, RG53.2
Lor peynir	Antalya	RS62.1

\* RS kodlu izolatlar 2000 µg/mL streptomisin ve RG kodlu izolatlar ise 500 µg/mL gentamisin içeren besiyeri ortamından izole edilmiştir

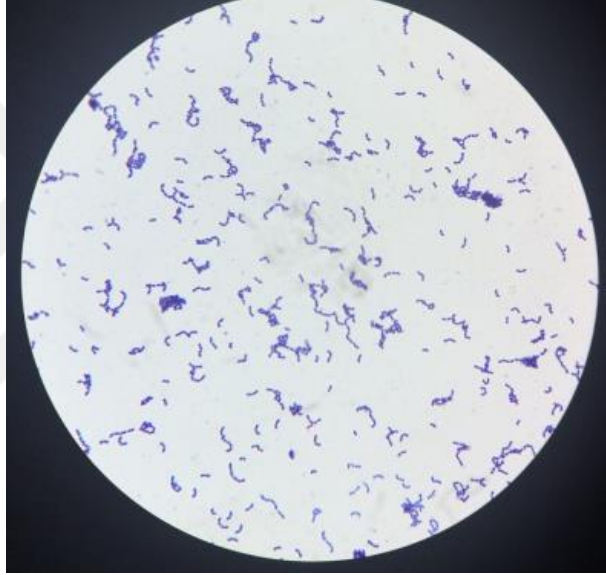
**Çizelge 4.1.** YSAD muhtemel *Enterococcus* suşlarının izolasyon kaynakları, örneklerin temin edildiği iller ve izolat kodları (Devam)

<b>İzolasyon kaynağı</b>	<b>Örneğin temin edildiği il</b>	<b>İzolat kodu*</b>
Kayseri köy peyniri	Isparta	RG73.1
Konya tulum peyniri	Isparta	RS74.1, RS74.2
Beyaz peynir	Antalya	RS85.1
Kaşar peyniri	Antalya	RS88.1
Çiğ süt	Isparta	RG7.1
Çoban peyniri	Isparta	RS12.1
Çiğ süt	Antalya	RG20.1, RG20.2, RG20.3, RG20.4
Beyaz peynir	Antalya	RS21.1, RS21.2
Koyun- keçi tulum peynir	Isparta	RG22.1, RG22.2, RG22.3, RG22.4
Yaprak tulum peyniri	Isparta	RG26.1, RG26.2, RG26.3
Bergama inek peyniri	Isparta	RS32.1, RS32.2
Keçi deri peyniri	Isparta	RS36.1

\* RS kodlu izolatlar 2000 µg/mL streptomisin ve RG kodlu izolatlar ise 500 µg/mL gentamisin içeren besiyeri ortamından izole edilmiştir



500 µg/mL gentamisin veya 2000 µg/mL streptomisin içeren besiyeri ortamlarından izole edilen toplam 59 YSAD muhtemel *Enterococcus* suşunun cins düzeyinde tanısı amacıyla Gram boyama, katalaz testi ve kültürel testler (10 °C, 37 °C ve 45 °C’de gelişme, pH’sı 9.6’ya ayarlanmış ve % 6.5 NaCl içeren besiyeri ortamlarında gelişme ve 60 °C’de 30 dk ısı direnç) yapılmıştır. Gram boyama yöntemi ile hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi sonucu; izolatların tamamının Gram pozitif kok morfolojisindeki (monokok, diplokok ve kısa zincir) olduğu tespit edilmiştir. RS25.1 nolu izolatin mikroskop görüntüsü Şekil 4.1’de verilmiştir. Katalaz testi ile izolatların tamamının katalaz negatif özellik gösterdiği belirlenmiştir.

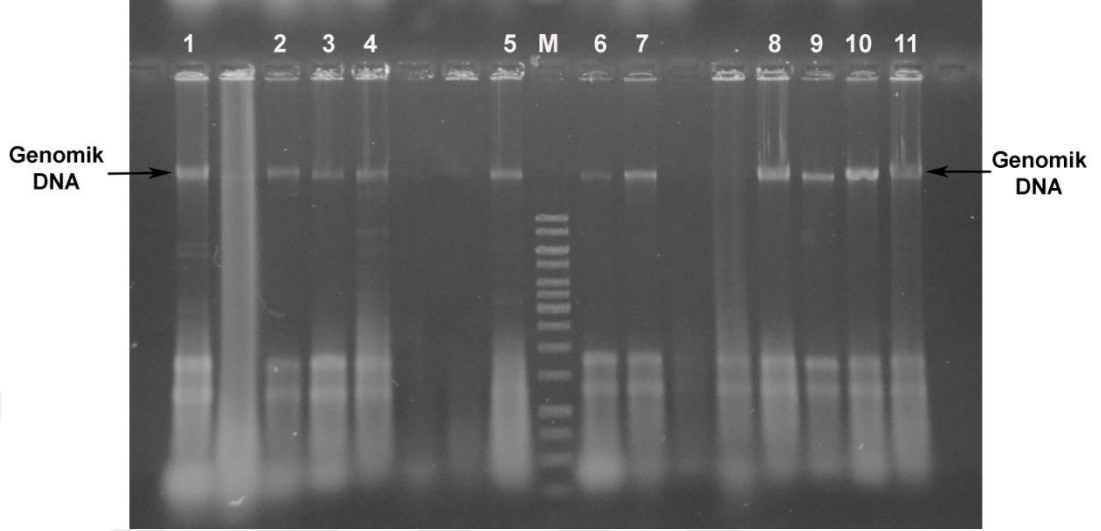


**Şekil 4.1.** RS25.1 nolu izolatin mikroskopik morfolojisi

Kültürel testler sonucu, seçilen 59 YSAD muhtemel enterokok izolatının 10 °C, 37 °C ve 45 °C inkübasyon sıcaklıklarında, pH’sı 9.6’ya ayarlanmış ve % 6.5 NaCl içeren MRS besiyeri ortamlarında (37 °C’de) gelişme gösterebildiği ve ayrıca 60 °C’de 30 dk ısı uygulamasına karşı da dirençli olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında izole edilen 59 suşun tamamının *Enterococcus* cinsi üyesi olduğu belirlenmiştir.

İzolatların cins düzeyinde tanısı morfolojik, biyokimyasal ve kültürel testlerin yanı sıra *Enterococcus* cinsine özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile moleküler düzeyde de yapılmıştır. Bu amaçla izolatların *Candida* vd.

(1992) tarafından önerilen yöntemle göre genomik DNA örnekleri izole edilmiştir. İzolatlara ait genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.

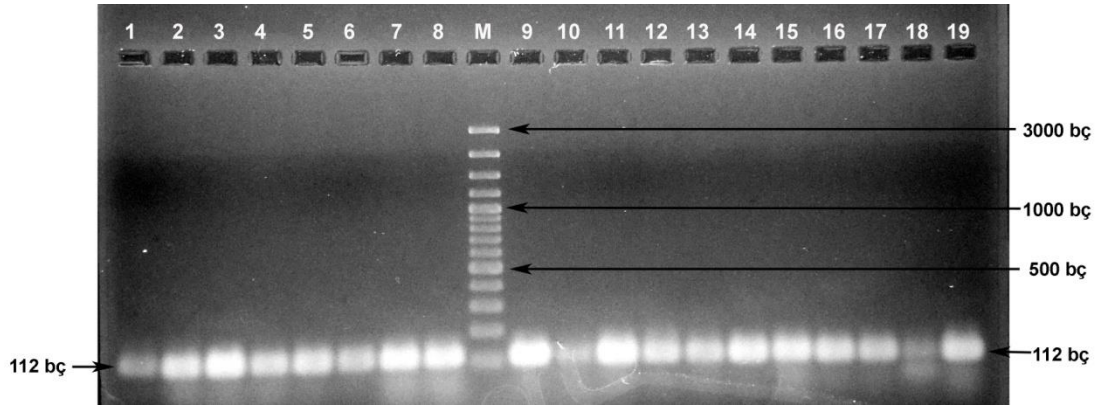


**Şekil 4.2.** YSAD muhtemel *Enterococcus* izolatlarının genomik DNA örnekleri

1-11 *Enterococcus* suşlarının genomik DNA’ sı

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

Genomik DNA örneklerinin şablon olarak kullanıldığı PZR denemeleri sonucu izolatların tamamının denemede kullanılan primerlerle *Enterococcus* cinsine özgü 112 kb büyüklükte fragmentler verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3). Elde edilen bu sonuçlar klasik tanı testlerinde elde edilen cins düzeyinde tanı sonuçlarını desteklemektedir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da çiğ süt (Tuncer vd., 2014; Bouymajane vd., 2018) ve geleneksel peynir (Yoğurtçu ve Tuncer, 2013; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Russo vd., 2018; Şanlıbaba ve Şentürk, 2018) örneklerinden YSAD *Enterococcus* izole edildiği bildirilmiştir. Yüksek seviyede aminoglikozid direnci gıda izolatlarına nazaran klinik enterokok izolatlarında daha sık karşılaşılan bir durumdur. Geçmiş yıllarda klinik örneklerden yüksek sıklıkla YSGD ve/veya YSSD *Enterococcus* izole edildiği rapor edilmiştir (Mendiratta vd., 2008; Niu vd., 2016; Shete vd., 2017; Amini vd., 2018).



**Şekil 4.3.** YSAD izolatların *Enterococcus* cinsine özgü primerler ile çoğaltılan PZR fragmentleri

1-18 YSAD *Enterococcus* izolatlarının PZR fragmentleri

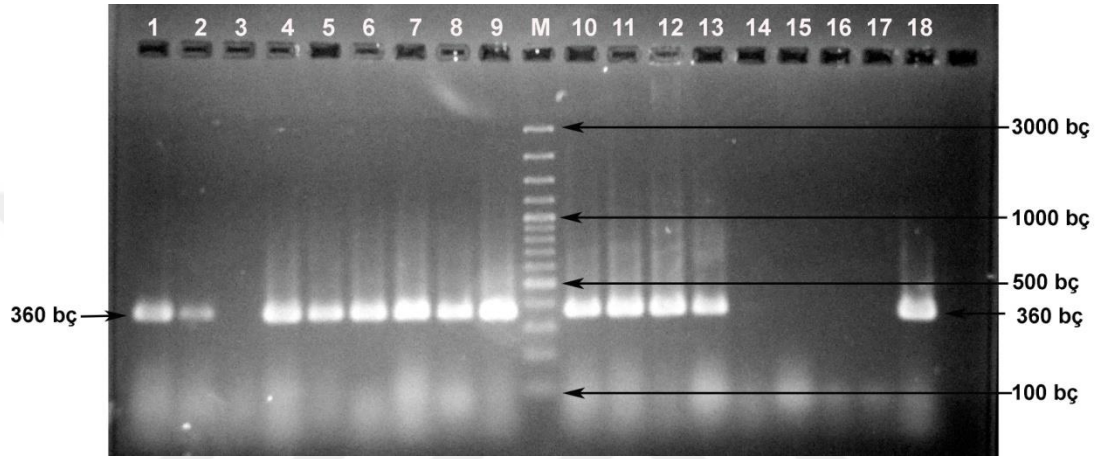
19 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (pozitif kontrol)

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

#### 4.2. YSAD *Enterococcus* izolatlarının Tür Düzeyinde Tanısı

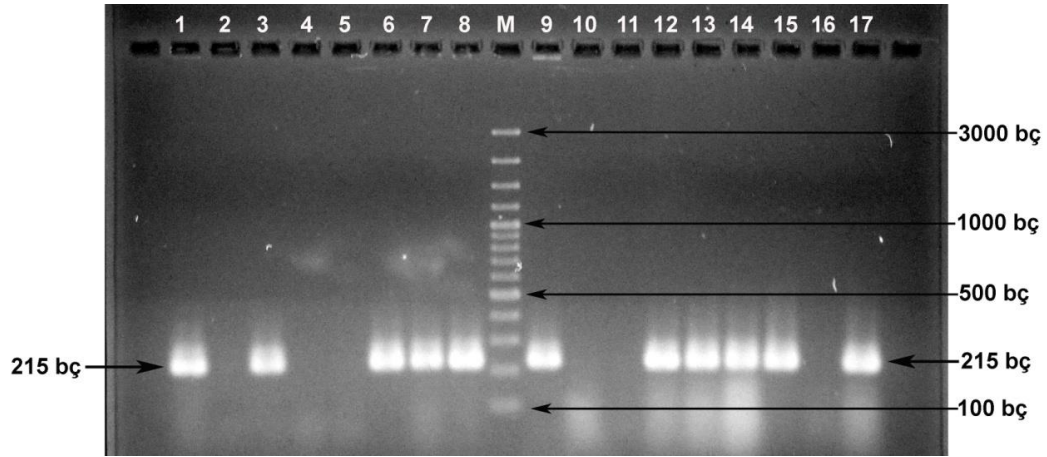
Enterokok türleri arasında önemli oranda fenotipik çeşitlilik söz konusudur. Bakterilerin tür ve alt tür düzeyinde tanıları; koloni morfolojileri, kültürel ve biyokimyasal özellikleri gibi fenotipik karakterleri belirlenerek yapılabilmektedir. Gıdalarda, hayvan yemlerinde tespit edilen (*E. faecium* ve *E. faecalis* gibi) veya gastrointestinal sistemin doğal florasında bulunan önemli türler için; güvenilir fenotipik tanımlama sistemleri (örneğin büyüme sıcaklıkları, fermentasyon paterni, seçici ortam vb.) uygulanabilir. Günümüzde fenotipik tanı yöntemlerinden daha ziyade güvenilir ve hızlı tanımlama yapılabilmesi için moleküler tabanlı yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle türe özgü primerler veya 16S/23S rRNA hedefli problemlerin farklı *Enterococcus* türlerinin tanımlanmasında başarı ile kullanılan yöntemler olduğu ispatlanmıştır (Klein, 2003; Jackson vd., 2004). Ayrıca tür içi farklılaşmada, protein parmak izi, rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR), darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) ve restriksiyon enzim analizi gibi yöntemler de kullanılabilir (Klein, 2003). Tez çalışması kapsamında elde edilen izolatların tür düzeyinde tanısı türe özgü primerler ve 16S rDNA dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında çiğ süt ve fermente süt ürünlerinden sıklıkla izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium*,

*E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii* türlerine özgü primer setleri kullanılmıştır. Türe özgü primerler kullanılarak yapılan tür düzeyinde tanı testleri sonucu izolatların 18'i *E. faecalis*, 18'i *E. faecium*, 13'ü *E. durans* ve 2'si *E. gallinarum* olarak tanımlanmıştır. Şekil 4.4. ve 4.5'de sırasıyla *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerine özgü primerler kullanılarak yapılan PZR denemesi sonucu elde edilen 360 kb ve 215 kb büyüklükteki PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir.



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

1	RS25.1	: 360 bç
2	RS25.2	: 360 bç
3	RS25.3	: -
4	RS25.4	: 360 bç
5	RS25.5	: 360 bç
6	RS21.1	: 360 bç
7	RS21.2	: 360 bç
8	RS27.1	: 360 bç
9	RS27.2	: 360 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
10	RS27.3	: 360 bç
11	RS27.4	: 360 bç
12	RS27.5	: 360 bç
13	RS27.6	: 360 bç
14	RS46.1	: -
15	RS46.2	: -
16	RS46.3	: -
17	Negatif kontrol (su)	: -
18	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	: 360 bç
	(pozitif kontrol)	



**Şekil 4.5.** YSAD *Enterococcus* izolatlarının *E. faecium*'a özgül primerler ile tür düzeyinde tanısı

1	RS36.2	: 215 bç
2	RS36.3	: -
3	RG36.1	: 215 bç
4	RS29.1	: -
5	RS50.1	: -
6	RG52.1	: 215 bç
7	RG52.2	: 215 bç
8	RG53.1	: 215 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
9	RG53.2	: 215 bç
10	RS62.1	: -
11	RS85.1	: -
12	RG73.1	: 215 bç
13	RS74.1	: 215 bç
14	RS74.2	: 215 bç
15	RS88.1	: 215 bç
16	Negatif kontrol (su)	: -
17	<i>E. faecium</i> ATCC 51559 (pozitif kontrol)	: 215 bç

Türe özgül primerler kullanılarak yapılan PZR ile 8 izolat (RS21.3, RS25.3, RS29.1, RG7.1, RG22.4, RG26.1, RG26.2 ve RG26.3) tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Bu izolatların 16S rDNA dizi analizi sonucu *E. faecalis* olarak tanımlanması üzerine türe özgül PZR işlemi tekrar edilmiş ve izolatların tamamının beklenildiği gibi *E. faecalis*'e özgül 360 kb büyüklükte fragmentler verdiği tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen 59 YSAD *Enterococcus* suşunun 26'sı *E. faecalis* (% 44.07), 18'i *E. faecium* (% 30.51), 13'ü *E. durans* (% 22.03) ve 2'si *E. gallinarum* (% 3.39) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısı

İzolat kodu	Bakteri Türü	İzolat kodu	Bakteri Türü
RS12.1	<i>Enterococcus faecium</i>	RS46.1	<i>Enterococcus durans</i>
RS21.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS46.2	<i>Enterococcus durans</i>
RS21.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS46.3	<i>Enterococcus durans</i>
RS21.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS50.1	<i>Enterococcus durans</i>
RS21.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS62.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
RS25.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS74.1	<i>Enterococcus faecium</i>
RS25.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS74.2	<i>Enterococcus faecium</i>
RS25.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS85.1	<i>Enterococcus durans</i>
RS25.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	RS88.1	<i>Enterococcus faecium</i>
RS25.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG7.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
RS27.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG20.1	<i>Enterococcus durans</i>
RS27.2	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG20.2	<i>Enterococcus faecium</i>
RS27.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG20.3	<i>Enterococcus faecium</i>
RS27.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG20.4	<i>Enterococcus faecium</i>
RS27.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG22.1	<i>Enterococcus durans</i>
RS27.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG22.2	<i>Enterococcus durans</i>
RS29.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG22.3	<i>Enterococcus faecium</i>
RS32.1	<i>Enterococcus faecium</i>	RG22.4	<i>Enterococcus faecalis</i>
RS32.2	<i>Enterococcus faecium</i>	RG26.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
RS32.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG26.2	<i>Enterococcus faecalis</i>
RS32.4	<i>Enterococcus durans</i>	RG26.3	<i>Enterococcus faecalis</i>
RS32.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG36.1	<i>Enterococcus faecium</i>
RS32.6	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG46.1	<i>Enterococcus gallinarum</i>
RS36.1	<i>Enterococcus faecium</i>	RG46.2	<i>Enterococcus gallinarum</i>
RS36.2	<i>Enterococcus faecium</i>	RG52.1	<i>Enterococcus faecium</i>
RS36.3	<i>Enterococcus durans</i>	RG52.2	<i>Enterococcus faecium</i>
RS36.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	RG53.1	<i>Enterococcus faecium</i>
RS42.1	<i>Enterococcus durans</i>	RG53.2	<i>Enterococcus faecium</i>
RS42.2	<i>Enterococcus durans</i>	RG73.1	<i>Enterococcus faecium</i>
RS42.3	<i>Enterococcus durans</i>		

Tez çalışması kapsamında çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSGD/YSSD *Enterococcus* türlerinin dağılımı Çizelge 4.3’de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSGD\*/YSSD\*\* *Enterococcus* türlerinin dağılımı

Bakteri türü	Çiğ süt	Peynir
	YSGD/YSSD	YSGD/YSSD
<i>E. faecalis</i> (n= 26)	1/-	4/21
<i>E. faecium</i> (n= 18)	3/-	7/8
<i>E. durans</i> (n= 13)	1/-	2/10
<i>E. gallinarum</i> (n= 2)	-/-	2/0
Toplam	5/-	15/39

\* YSGD: Yüksek seviyede gentamisin dirençli

\*\* YSSD: Yüksek seviyede streptomisin dirençli

Enterokoklar gıdalarda uzun süre fekal kontaminasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ancak son zamanlarda süt ürünlerinin genel mikrobiyotasının bir parçası olarak da dikkat çekmektedirler. Özellikle çiğ veya pastörize süttten üretilen peynirlerde doğal starter süt kültürü olarak kullanılır ve bu nedenle bu ürünlerden sıklıkla izole edilirler (Saavedra vd., 2003; Morandi vd., 2015). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda geleneksel peynir örneklerinden izole edilen *Enterococcus* cinsi üyesi bakteriler arasında *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*’ın baskın türler olduğu rapor edilmiştir (El-Din vd., 2002; De Vuyst, 2000; Cocconcelli vd., 2003; Giraffa, 2003; Belicová vd., 2007; Tuncer, 2009; Yoğurtçu ve Tuncer, 2013; Morandi vd., 2015; Fuka vd., 2017; Russo vd., 2018). Tez çalışmasında her ne kadar genel bir *Enterococcus* izolasyonu yapılması amaçlanmamış olsada süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* türleri arasında *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* baskın türlerdir. Çiğ süt ve geleneksel peynir örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türlerinin antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı çalışmalarda ise YSAD *E. faecalis*, *E. faecium* ve/veya *E. durans* türlerine rastlandığı bildirilmiştir (Yoğurtçu ve Tuncer, 2013; Tuncer vd., 2014; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Bouymajane vd., 2018; Russo vd., 2018; Şanlıbaba ve Şentürk, 2018).

Diğer taraftan tez kapsamında kullanılan örnek gruplarından farklı olarak YSAD *Enterococcus* türlerinin yaygınlığının belirlenmesinin amaç edinildiği çalışmalarda Jaimee ve Halami (2016), çiftlik hayvanları ve ticari et ürünlerinde, Lan vd. (2016), Tibet domuzlarında ve Niu vd. (2016), klinik izolatlarda YSAD *E. faecalis* ve *E. faecium* varlığını rapor etmişlerdir. Jaimee ve Halami (2016), çiftlik hayvanı bağırsağından ve ticari et ürünlerinden (çiğ et, tavuk sosisi, jambon ve salam) oluşan 50 örnekte YSGD LAB izolasyonu yapmışlar ve izole ettikleri 138 LAB kültürünün 101'inin *Enterococcus* cinsi üyesi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar YSGD izolatlar arasında *E. faecalis* türü üyelerinin çoğunluğu oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Lan vd. (2016), YSAD *Enterococcus* izolasyonu yaptıkları 105 Tibet domuzu feçes örneğinden 51 *Enterococcus* cinsi üyesi izole etmişler ve % 53 ile en sık rastlanan türün *E. hirae* olduğunu bunu % 29 ile *E. faecalis*'in takip ettiğini rapor etmişlerdir. Klinik enterokok izolatlarında YSAD bulunma sıklığının araştırıldığı bir başka çalışmada, test edilen 117 enterokok izolatının % 42.7'sinin (50/117) YSGD ve % 27.4'ünün (32/117) ise YSSD olduğu tespit edilmiştir. *E. faecium* izolatlarının yüksek direnç profili gösterdiği belirlenmiştir. Bu türü *E. faecalis* ve *E. avium*'un takip ettiği bildirilmiştir.

#### **4.3. YSAD *Enterococcus* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilleri**

Enterokoklar özellikle bazı fermente et ürünlerinin ve peynir çeşitlerinin mikrobiyotasının önemli bir bölümünü oluştururlar (Giraffa, 2003). Bu bakteriler Akdeniz ülkelerinde geleneksel peynirlerin üretimi sırasında asidifikasyon, proteoliz, sitrattan yararlanma, uçucu aromatik bileşikler üretme gibi fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıdaların duyuşal özelliklerini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (El-Din vd., 2002; De Vuyst, 2000; Cocconcelli vd., 2003). Diğer taraftan bazı *Enterococcus* türleri ciddi hastalıklardan sorumlu önemli fırsatçı patojenlerdir. Özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri nozokomiyal enfeksiyonların/süper enfeksiyonların en yaygın nedenleri arasında gösterilmektedir (Oravcova, 2013). Enterokokların patojenitesine katkıda bulunan önemli faktörlerin başında bu bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç gelmektedir (Yoğurtcu ve Tuncer, 2013). Tez çalışması kapsamında antibiyotik direnç profilleri araştırılan 59 YSAD *Enterococcus* izolatının 18 ticari antibiyotiğe karşı direnç profilleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.



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

Bakteriler	Antibiyotikler*																	
	AMP	DO	E	CN	C	LEV	LZD	QD	MH	F	NOR	P	RD	CIP	S	TEC	TE	VA
<i>E. faecium</i> RS12.1	R**	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
<i>E. faecalis</i> RS21.1	S	R	R	S	R	S	I	R	R	S	I	S	I	I	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS21.2	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	I	S	I	I	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS21.3	R	R	R	S	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	I	I	R	R
<i>E. faecalis</i> RS21.4	R	R	R	S	I	I	R	I	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R
<i>E. faecalis</i> RS25.1	S	I	I	S	I	S	R	R	R	S	S	S	R	I	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS25.2	S	I	I	S	I	S	I	R	I	S	S	S	R	I	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS25.3	S	I	I	S	I	S	R	R	I	S	S	R	R	I	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS25.4	S	I	I	S	I	S	R	R	I	S	S	S	R	S	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS25.5	S	I	I	S	S	S	S	R	I	S	S	R	R	S	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS27.1	S	I	I	S	S	S	S	R	I	S	S	S	I	S	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS27.2	S	I	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS27.3	S	I	I	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS27.4	S	S	I	S	S	S	I	R	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS27.5	S	I	I	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS27.6	S	S	I	S	S	S	I	R	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS29.1	S	R	R	S	R	I	R	R	R	S	I	S	R	R	R	S	R	R
<i>E. faecium</i> RS32.1	R	I	R	S	I	S	S	I	I	S	I	R	R	I	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> RS32.2	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS32.3	S	I	I	S	S	S	S	R	I	S	I	S	S	S	R	S	R	S
<i>E. durans</i> RS32.4	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	I	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS32.5	S	R	R	S	R	I	S	R	R	S	I	S	S	I	R	S	R	R
<i>E. faecalis</i> RS32.6	S	R	R	S	R	I	S	R	R	S	I	S	I	I	R	S	R	I

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

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

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

Bakteriler	Antibiyotikler*																	
	AMP	DO	E	CN	C	LEV	LZD	QD	MH	F	NOR	P	RD	CIP	S	TEC	TE	VA
<i>E. faecium</i> RS36.1	S**	R	R	S	S	R	I	R	R	S	I	S	S	R	R	I	R	I
<i>E. faecium</i> RS36.2	R	R	R	S	I	R	I	I	R	S	R	R	S	R	R	S	R	I
<i>E. durans</i> RS36.3	S	R	R	S	I	S	R	I	I	I	S	R	S	S	R	S	R	I
<i>E. faecalis</i> RS36.4	S	R	I	S	S	S	S	I	R	S	I	S	S	I	I	S	R	I
<i>E. durans</i> RS42.1	S	R	R	I	S	I	S	R	I	S	I	R	R	S	I	S	R	S
<i>E. durans</i> RS42.2	S	R	R	S	S	S	R	I	I	R	S	R	I	S	I	S	R	S
<i>E. durans</i> RS42.3	S	R	R	S	S	S	I	S	R	I	S	R	S	S	I	S	R	I
<i>E. durans</i> RS46.1	S	R	R	I	I	S	I	S	R	I	S	R	S	I	R	S	R	S
<i>E. durans</i> RS46.2	S	R	R	I	S	S	I	I	R	I	I	R	R	S	R	S	R	S
<i>E. durans</i> RS46.3	S	I	R	S	S	S	S	I	I	I	S	R	R	S	R	S	R	S
<i>E. durans</i> RS50.1	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecalis</i> RS62.1	S	R	R	S	R	I	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>E. faecium</i> RS74.1	R	R	R	S	R	R	I	S	R	I	R	R	R	R	R	S	R	I
<i>E. faecium</i> RS74.2	R	R	R	S	I	R	S	S	R	S	I	R	S	R	R	S	R	I
<i>E. durans</i> RS85.1	S	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S
<i>E. faecium</i> RS88.1	R	R	R	S	I	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i> RG7.1	R	R	I	R	I	I	S	S	R	S	I	R	R	I	S	S	R	S
<i>E. durans</i> RG20.1	R	R	I	R	I	R	I	I	R	S	R	R	R	I	S	S	R	I
<i>E. faecium</i> RG20.2	R	S	R	R	I	R	R	I	R	S	R	R	R	R	I	I	R	I
<i>E. faecium</i> RG20.3	R	R	R	R	I	R	S	I	R	I	R	R	R	R	S	I	R	I
<i>E. faecium</i> RG20.4	R	R	R	R	I	R	I	I	R	I	R	R	R	R	S	I	R	I
<i>E. durans</i> RG22.1	S	I	S	R	S	S	R	S	R	R	I	S	S	S	S	S	R	I
<i>E. durans</i> RG22.2	S	R	S	R	S	S	R	I	R	I	I	S	S	S	S	S	R	I

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

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

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

Bakteriler	Antibiyotikler*																	
	AMP	DO	E	CN	C	LEV	LZD	QD	MH	F	NOR	P	RD	CIP	S	TEC	TE	VA
<i>E. faecium</i> RG22.3	R**	S	I	R	S	I	S	I	S	S	I	R	S	I	S	S	S	I
<i>E. faecalis</i> RG22.4	S	I	I	R	I	I	R	I	R	S	I	S	R	I	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i> RG26.1	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	I	S	R	I	S	S	S	S
<i>E. faecalis</i> RG26.2	S	S	I	R	S	S	S	S	S	R	I	S	R	I	S	S	S	S
<i>E. faecalis</i> RG26.3	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	I	S	R	I	S	S	S	S
<i>E. faecium</i> RG36.1	S	R	I	I	S	I	S	S	S	S	I	R	S	I	S	S	R	S
<i>E. gallinarum</i> RG46.1	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	I
<i>E. gallinarum</i> RG46.2	R	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	S	I	R	S	I	R	I
<i>E. faecium</i> RG52.1	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>E. faecium</i> RG52.2	S	S	I	R	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	I	S	R	S
<i>E. faecium</i> RG53.1	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
<i>E. faecium</i> RG53.2	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>E. faecium</i> RG73.1	R	R	I	R	I	R	S	I	R	S	R	R	R	I	S	S	R	S

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

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

Disk difüzyon testi sonucu YSAD *Enterococcus* izolatlarının 1 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar arasında en geniş antibiyotik direnç profiline sahip suşun *E. faecium* RS12.1 olduğu belirlenmiştir. 500 µg/mL gentamisin içeren besiyeri ortamlarından izole edilen 20 YSGD *Enterococcus* izolatının disk difüzyon testi sonucu 18'inin gentamisine dirençli ve 2'sinin (*E. faecium* RG36.1 ve RG53.2) orta seviyede dirençli olduğu belirlenmiştir. 2000 µg/mL streptomisin içeren besiyeri ortamlarından izole edilen 39 YSSD *Enterococcus* izolatlarının ise 33'ü streptomisine dirençli ve 6'sı (*E. faecalis* RS21.3, RS21.4, RS36.4, *E. durans* RS42.1, RS42.2 ve RS42.3) orta seviyede dirençli bulunmuştur (Çizelge 4.4). YSAD *Enterococcus* izolatlarının tez kapsamında kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

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

Antibiyotikler	S*		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Ampisilin	42	71.19	0	0	17	28.81
Doksisiklin	10	16.95	18	30.50	31	52.54
Eritromisin	2	3.39	26	44.07	31	52.54
Gentamisin	36	61.02	5	8.47	18	30.50
Kloramfenikol	30	50.85	20	33.9	9	15.25
Levofloksasin	35	59.32	10	16.95	14	23.73
Linezolid	28	47.46	13	22.03	18	30.50
Minosiklin	11	18.64	17	28.81	31	52.54
Nitrofurantoin	41	69.49	10	16.95	8	13.56
Norfloksasin	24	40.68	21	35.59	14	23.73
Penisilin G	29	49.15	0	0	30	50.85
Quinupristin/dalfopristin	15	25.42	23	38.98	21	35.59
Rifampin	25	42.37	6	10.17	28	47.46
Siprofloksasin	24	40.68	21	35.59	14	23.73
Streptomisin	17	28.81	9	15.25	33	55.93
Teikoplanin	49	83.05	9	15.25	1	1.69
Tetrasiklin	4	6.78	2	3.39	53	89.83
Vankomisin	26	44.07	25	42.37	8	13.56

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

YSAD *Enterococcus* izolatlarına karşı en etkili antibiyotiğin teikoplanin (% 83.05) olduğu saptanmıştır. YSGD izolatlarının % 75'i, YSSD izolatlarının ise % 87.18'i teikoplanine duyarlı bulunmuştur. Teikoplanini takiben YSAD izolatlarının ampisilin (% 71.19), nitrofurantoin (% 69.49), gentamisin (% 61.02) ve levofloksasine

(% 59.32) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak El-Ghazawy vd. (2016), klinik YSAD enterokok izolatlarının araştırmada kullanılan antibiyotikler içerisinde en çok tigesiklin, linezolid, vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar izolatların sadece % 2.1'inin linezolide, % 6.3'ünün vankomisine ve % 6.3'ünün teikoplanine karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak diğer taraftan araştırmacıların bulgularının aksine tez kapsamında YSAD izolatlarının % 13.56'sı vankomisine ve % 30.50'si linezolide dirençli bulunmuştur. Tez kapsamında YSAD izolatlarının en çok tetrasikline (% 89.83) dirençli olduğu saptanmıştır. YSGD izolatlarının % 70'i ve YSSD izolatlarının ise tamamı tetrasikline dirençli bulunmuştur. Tetrasiklini takiben YSAD izolatlarının streptomisin (% 55.93), doksisisiklin (% 52.54), eritromisin (% 52.54), minosiklin (% 52.54), penisilin G (% 50.85) ve rifampine (% 47.46) karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Tezde elde edilen sonuçların aksine Mendritta vd. (2008), Hindistan'da klinik enterokok izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profillerini belirledikleri çalışmalarında YSAD enterokok izolatlarının en çok  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler olan penisilin (% 92.39) ve ampisiline (% 88.04) dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu antibiyotiklerin yanı sıra YSAD izolatlarının % 79.35'inin eritromisine, % 75'inin siprofloksasine, % 66.30'unun tetrasikline, % 36.96'sının rifampine ve % 22.83'ünün kloramfenikole dirençli olduğunu rapor etmişlerdir.

Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* türlerinin antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri izelge 4.6' da verilmiştir. İzolatlar arasında antibiyotiklere en dirençli türün *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin antibiyotik dirençlerinin izolasyon kaynağına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Chajacka-Wierzchowska vd. (2012) tüketime hazır hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik dirençleri arasında oldukça benzerlik olduğunu rapor etmiştir. Baylan vd. (2011), üriner *E. faecium* izolatlarında yüksek seviyede aminoglikozid direncinin diğer türlere nazaran daha yaygın olduğunu saptamıştır. Diğer taraftan, Yogurtcu ve Tuncer (2013) Tulum peyniri örneklerinden, Demirgöl ve Tuncer (2017) fermente sucuk örneklerinden ve Russo vd. (2018) geleneksel Sicilya peynirlerinden izole edilen enterokoklar arasında test edilen antibiyotiklere karşı en dirençli türün *E. faecalis* olduğunu bildirmiştir.

**Çizelge 4.6.** YSAD *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri

Antibiyotikler	<i>E. faecalis</i> (n: 26)			<i>E. faecium</i> (n: 18)			<i>E. durans</i> (n: 13)			<i>E. gallinarum</i> (n: 2)		
	S*	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ampisilin	88.46	0	11.53	38.89	0	61.11	92.30	0	7.69	0	0	100
Doksisiklin	19.23	42.30	38.46	27.78	16.66	55.55	0	23.08	76.92	0	50	50
Eritromisin	0	69.23	30.76	0	33.33	66.67	15.38	15.38	69.23	0	0	100
Kloramfenikol	46.15	26.92	26.92	44.44	44.44	11.12	76.92	23.08	0	0	100	0
Gentamisin	44.44	11.12	44.44	80.77	0	19.23	53.85	23.08	23.08	0	0	100
Levofloksasin	69.23	26.92	3.84	33.33	11.12	55.55	84.62	7.69	7.69	0	0	100
Linezolid	50	15.38	34.61	55.55	27.78	16.66	38.46	30.77	30.77	0	0	100
Minosiklin	61.53	42.30	46.15	33.33	11.12	55.55	15.38	30.77	53.85	0	0	100
Nitrofurantoin	84.61	3.84	11.53	77.78	16.67	5.56	38.46	46.15	15.38	0	0	100
Norfloksasin	42.30	46.15	11.53	27.78	27.78	44.44	61.54	30.77	7.69	0	0	100
Penisilin G	80.77	0	19.23	27.78	0	72.22	15.38	0	84.62	50	0	50
Quinupristin/dalfopristin	15.38	19.23	65.38	38.89	50	11.12	30.77	61.54	7.69	0	50	50
Rifampin	15.38	15.38	53.84	55.55	0	44.44	53.85	7.69	38.46	0	50	50
Siprofloksasin	34.61	50	15.38	27.78	22.22	50	76.92	23.08	0	0	50	50
Streptomisin	44.44	11.12	44.44	19.23	11.53	69.23	23.08	23.08	53.85	50	50	0
Teikoplanin	92.30	7.69	0	66.67	27.78	5.56	100	0	0	0	100	0
Tetrasiklin	11.53	0	88.46	5.56	11.12	83.33	0	0	100	0	0	100
Vankomisin	38.46	38.46	23.07	44.44	44.44	11.12	61.54	38.46	0	0	100	0

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

Tez çalışması kapsamında farklı süt ve süt ürünlerinden izole edilen 59 YSAD *Enterococcus* izolatının 57'sinin (% 94.92) 2 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. YSAD *Enterococcus* izolatlarının % 89.83 (53/59) çoklu antibiyotik direncine (en az üç antibiyotiğe karşı dirençli) sahip oldukları belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonucu YSAD *Enterococcus* izolatları arasında en yüksek sıklıkla karşılaşılan çoklu antibiyotik direnç profillerinin % 8.47 ile QD-S-TE ve % 5.08 ile DO-E-C-QD-MH-S-TE olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Çoklu antibiyotik direnci enterokoklarda oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. Tezde elde edilen bulgulara benzer olarak pek çok araştırmacı farklı kaynaklardan izole ettikleri enterokok suşlarının çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu bildirmiştir (Dilik ve İstanbulluoğlu, 2010; Fard vd., 2011; Yoğurtcu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Demirgöl ve Tuncer, 2017). Dilik ve İstanbulluoğlu, (2010)'un yapmış olduğu çalışmada 229 broiler enterokok suşunun 47'sinin (% 20.5) iki, 40'ının (% 17.4) üç, 19'unun (% 8.2) dört, 11'inin (% 4.8) beş ve 9'unun (% 3.9) altı antibiyotiğe dirençli olduğunu belirlenmiştir. Fard vd., (2011), yapmış olduğu çalışmalarında domuz bağırsağından izole ettikleri tüm enterokokların en az iki antibiyotiğe dirençli olduğu bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada tulum peynirinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının % 4.3'ünün çoklu antibiyotik direncine (streptomisin, tetrasiklin) sahip olduğu belirtilmiştir (Yoğurtcu ve Tuncer, 2013). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada ise Yüceer ve Özden Tuncer (2015) sucuktan izole ettikleri *Enterococcus* suşlarının % 68'inin çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Yine sucuktan izole edilen enterokok izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin ve direnç genlerinin araştırıldığı bir çalışmada izolatların % 61.67'sinin 2 ile 8 arasında değişen sayıda antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği ve en yaygın gözlenen antibiyotik direnç profilinin % 11.67 ile siprofloksasin ve rifampin direnci olduğu bildirilmiştir (Demirgöl ve Tuncer, 2017). Bouymajane vd. (2018), çiğ süttten izole ettikleri *Enterococcus* türleri arasında çoklu antibiyotik direncinin oldukça yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak Russo vd. (2018), geleneksel Sicilya peynirlerinden izole ettikleri 110 *Enterococcus* izolatının 107'sinin (% 97) çoklu antibiyotik direnç fenotipi gösterdiğini belirlemişlerdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada geleneksel peynir örneklerinden izole edilen 213 enterokok izolatının 151'inin (% 70.90) çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Sanlibaba ve Senturk, 2018).

**Çizelge 4.7.** Çoklu antibiyotik direnç özelliği gösteren izolatların dirençli olduğu antibiyotikler, dirençli izolat sayısı ve yüzdeleri (%)

<b>Antibiyotikler*</b>	<b>Dirençli İzolat sayısı</b>	<b>%</b>
QD-S-TE	5	8.47
DO-MH-TE	1	1.69
AMP-CN-P	1	1.69
CN-F-RD	2	3.39
DO-P-TE	1	1.69
QD-RD-S-TE	1	1.69
LZD-QD-S-TE	1	1.69
E-P-S-TE	1	1.69
DO-P-S-TE	1	1.69
LZD-QD-RD-S-TE	1	1.69
QD-P-RD-S-TE	1	1.69
E-P-RD-S-TE	2	3.39
DO-E-MH-P-TE	1	1.69
CN-LZD-MH-F-TE	1	1.69

\*AMP: Ampisilin; C: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; CN: Gentamisin; DO: Doksisiklin; E: Eritromisin; F: Nitrofurantoin; LEV: levofloksasin; LZD: Linezolid; MH: Minosiklin; NOR: Norfloksasin; P: Penisilin G; QD: Quinupristin/dalfopristin; RD: Rifampin; S:Streptomisin; TE: Tetrasiklin; TEC: Teikoplanin ve VA: Vankomisin.



**Çizelge 4.7.** Çoklu antibiyotik direnç özelliği gösteren izolatların dirençli olduğu antibiyotikler, dirençli izolat sayısı ve yüzdeleri (%) (Devam)

<b>Antibiyotikler*</b>	<b>Dirençli İzolat sayısı</b>	<b>%</b>
DO-CN-LZD-MH-TE	1	1.69
LZD-QD-MH-RD-S-TE	1	1.69
LZD-QD-P-RD-S-TE	1	1.69
AMP-E-P-RD-S-TE	1	1.69
DO-E-LZD-P-S-TE	1	1.69
DO-E-QD-P-RD-TE	1	1.69
DO-E-LZD-F-P-TE	1	1.69
DO-E-MH-P-S-TE	1	1.69
CN-LZD-MH-RD-TE-VA	1	1.69
DO-E-C-QD-MH-S-TE	3	5.08
DO-E-MH-P-RD-S-TE	1	1.69
AMP-DO-CN-MH-P-RD-TE	1	1.69
DO-E-C-QD-MH-S-TE-VA	1	1.69
DO-E-LEV-QD-MH-CIP-S-TE	1	1.69

\*AMP: Ampisilin; C: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; CN: Gentamisin; DO: Doksisisiklin; E: Eritromisin; F: Nitrofurantoin; LEV: levofloksasin; LZD: Linezolid; MH: Minosiklin; NOR: Norfloksasin; P: Penisilin G; QD: Quinupristin/dalfopristin; RD: Rifampin; S:Streptomisin; TE: Tetrasiklin; TEC: Teikoplanin ve VA: Vankomisin.

**Çizelge 4.7.** Çoklu antibiyotik direnç özelliği gösteren izolatların dirençli olduğu antibiyotikler, dirençli izolat sayısı ve yüzdeleri (%) (Devam)

<b>Antibiyotikler*</b>	<b>Dirençli İzolat sayısı</b>	<b>%</b>
AMP-DO-E-LEV-MH-P-CIP-S-TE	1	1.69
AMP-DO-CN-LEV-MH-NOR-P-RD-TE	2	3.39
AMP-DO-E-LEV-MH-NOR-P-CIP-S-TE	1	1.69
DO-E-C-LZD-QD-MH-RD-CIP-S-TE-VA	1	1.69
AMP-E-CN-LEV-LZD-MH-NOR-P-RD-CIP-TE	1	1.69
AMP-DO-E-CN-LEV-MH-NOR-P-RD-CIP-TE	2	3.39
AMP-DO-E-CN-LEV-LZD-MH-F-NOR-CIP-TE	1	1.69
AMP-DO-E-LZD-MH-F-NOR-P-RD-CIP-TE-VA	1	1.69
DO-E-C-LZD-QD-MH-NOR-RD-CIP-S-TE-VA	1	1.69
AMP-DO-E-C-LEV-MH-NOR-P-RD-CIP-S-TE	1	1.69
AMP-E-CN-LEV-LZD-QD-MH-F-NOR-P-RD-TE	1	1.69
AMP-DO-E-C-LEV-LZD-MH-NOR-P-RD-CIP-TE-VA	1	1.69
AMP-DO-E-LEV-LZD-MH-NOR-P-RD-CIP-S-TEC-TE-VA	1	1.69
AMP-DO-E-C-LEV-LZD-QD-MH-F-NOR-P-RD-CIP-S-TE-VA	1	1.69

\*AMP: Ampisilin; C: Kloramfenikol; CIP: Siprofloksasin; CN: Gentamisin; DO: Doksisisiklin; E: Eritromisin; F: Nitrofurantoin; LEV: levofloksasin; LZD: Linezolid; MH: Minosiklin; NOR: Norfloksasin; P: Penisilin G; QD: Quinupristin/dalfopristin; RD: Rifampin; S:Streptomisin; TE: Tetrasiklin; TEC: Teikoplanin ve VA: Vankomisin.

Antibiyotik direncin bakteriler arasında yayılması global düzeyde endişeye yol açmaktadır. Antibiyotikler hayvan yetiştiriciliğinde büyümeyi destekleyici olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde klinik öneme sahip antibiyotiklerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı kommensal bakterilerde bu ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olmaktadır (Cocconcelli vd., 2003; Mathur ve Singh, 2005; Garrido vd., 2014). Enterokoklar, antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında rezervuar görevi görebilmektedir. Bu nedenle tez kapsamında izole edilen YSAD *Enterococcus* suşlarının aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yanı sıra klinik olarak öneme sahip antibiyotiklere de direnç göstermesi tüketici sağlığı açısından endişe uyandırıcıdır.

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

Tez çalışması kapsamında YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisine karşı MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı gösterdikleri MİK değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir. İzolatların streptomisin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı MİK değerlerinin 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. MİK testi sonucu YSSD izolatlarının tamamı streptomisine, YSGD izolatlarının tamamı ise gentamisine dirençli bulunmuştur (MİK  $\geq$ 4096 µg/mL). Aynı zamanda YSSD izolatlarının % 87.18’inin gentamisine ve YSGD izolatlarının ise % 65’inin streptomisine karşı yüksek seviyede dirence sahip olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen 59 YSAD *Enterococcus* izolatının 47’sinin (% 79.66) hem YSSD hem de YSGD oldukları tespit edilmiştir. Lan vd. (2016), Tibet domuzu feçes örneğinden izole ettikleri *Enterococcus* izolatlarının % 76.5’inin gentamisin ve % 68.6’sının streptomisin MİK değerinin sırasıyla  $\geq$ 512 ve  $\geq$ 2048 µg/mL olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca izolatların % 39.2’sinin hem YSGD hem de YSSD olduğunu rapor etmişlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile Dünya genelinde klinik örneklerden YSGD (MİK  $\geq$ 500 µg/mL) ve YSSD (MİK  $\geq$ 2000 µg/mL) enterokokların izole edildiği rapor edilmiştir (Mendiratta vd., 2008; Agarwal vd., 2009; Jain vd., 2011; Jyothi vd., 2014; Niu vd., 2016).

**Çizelge 4.8.** YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı MİK değerleri

<b>Bakteri</b>	<b>Gentamisin MİK (µg/mL)</b>	<b>Streptomisin MİK (µg/mL)</b>	<b>Toplam direnç</b>
<i>E. faecium</i> RS12.1	2048 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS21.1	512 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS21.2	2048 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS21.3	4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS21.4	512 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS25.1	4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS25.2	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS25.3	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS25.4	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS25.5	4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS27.1	2048 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS27.2	1024 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS27.3	2048 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS27.4	2048 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS27.5	512 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS27.6	512 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS29.1	1024 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RS32.1	2048 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RS32.2	128	>4096 <sup>R</sup>	1
<i>E. faecalis</i> RS32.3	128	>4096 <sup>R</sup>	1
<i>E. durans</i> RS32.4	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS32.5	64	>4096 <sup>R</sup>	1
<i>E. faecalis</i> RS32.6	64	>4096 <sup>R</sup>	1
<i>E. faecium</i> RS36.1	1024 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RS36.2	128	>4096 <sup>R</sup>	1
<i>E. durans</i> RS36.3	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS36.4	4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS42.1	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS42.2	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS42.3	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS46.1	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS46.2	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS46.3	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS50.1	4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RS62.1	1024 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RS74.1	512 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RS74.2	512 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RS85.1	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RS88.1	4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RG7.1	>4096 <sup>R</sup>	512 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RG20.1	>4096 <sup>R</sup>	256	1
<i>E. faecium</i> RG20.2	>4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2

<sup>R</sup> Dirençli

**Çizelge 4.8.** YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı MİK değerleri (Devam)

Bakteri	Gentamisin MİK (µg/mL)	Streptomisin MİK (µg/mL)	Toplam direnç
<i>E. faecium</i> RG20.3	>4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RG20.4	4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RG22.1	>4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. durans</i> RG22.2	>4096 <sup>R</sup>	256	1
<i>E. faecium</i> RG22.3	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RG22.4	>4096 <sup>R</sup>	1024 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RG26.1	4096 <sup>R</sup>	1024 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RG26.2	>4096 <sup>R</sup>	1024 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecalis</i> RG26.3	>4096 <sup>R</sup>	1024 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RG36.1	>4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. gallinarum</i> RG46.1	>4096 <sup>R</sup>	4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. gallinarum</i> RG46.2	>4096 <sup>R</sup>	64	1
<i>E. faecium</i> RG52.1	>4096 <sup>R</sup>	512 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> RG52.2	>4096 <sup>R</sup>	64	1
<i>E. faecium</i> RG53.1	>4096 <sup>R</sup>	128	1
<i>E. faecium</i> RG53.2	>4096 <sup>R</sup>	128	1
<i>E. faecium</i> RG73.1	>4096 <sup>R</sup>	64	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	128	256	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2
<i>E. faecium</i> ATCC 51559	>4096 <sup>R</sup>	>4096 <sup>R</sup>	2

<sup>R</sup> Dirençli

Gentamisin (500 µg/mL) içeren besiyeri ortamından izole edilen *E. faecium* RG36.1 ve RG53.2 disk difüzyon testi sonucu gentamisine orta seviyede dirençli bulunmuştur. Ancak MİK testi sonucu bu suşların gentamisine dirençli (MİK ≥4096 µg/mL) oldukları belirlenmiştir. Disk difüzyon ve MİK testi sonuçları arasında % 10 minör hata tespit edilmiştir. Benzer durum streptomisin (2000 µg/mL) içeren besiyeri ortamından izole edilen *E. faecalis* RS21.3, RS21.4, RS36.4, *E. durans* RS42.1, RS42.2 ve RS42.3 için de belirlenmiştir. Disk difüzyon testi sonucu streptomisine orta seviyede dirençli olan bu suşlar MİK testi sonucu dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon ve MİK test sonuçları arasında % 15.39 minör hata saptanmıştır.

YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin için disk difüzyon ve MİK test sonuçları birlikte değerlendirildiği zaman ise minör ve major hata oranlarının yükseldiği görülmektedir. YSAD izolatlarında gentamisine karşı disk

difüzyon ve MİK test sonuçları arasında % 8.48 minör hata ve % 52.54 major hata tespit edilmiştir. Hata oranının artması streptomisin içeren besiyerinden izole edilen YSSD suşlarının büyük bir çoğunluğunun gentamisine karşı her iki testte farklı sonuç vermesinden kaynaklanmaktadır. Benzer durum streptomisin için de söz konusudur. Streptomisin için disk difüzyon ve MİK test sonuçları arasında minör hata % 15.25 ve major hata % 18.64 olarak hesaplanmıştır. Gentamisin içeren besiyeri ortamından izole edilen YSGD suşların streptomisin disk difüzyon ve MİK testlerinde yüksek hata vermesi hata oranını arttırmaktadır. Disk difüzyon ve MİK testleri arasında hata oranlarının yüksek çıkması üzerine her iki test tekrar edilmiştir. Tekrar edilen testlerde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da antibiyotik disk difüzyon ve MİK testleri arasında minör ve majör hataların tespit edildiği bildirilmiştir (Akers vd., 2010; Hope vd., 2010; Liu vd., 2012; İşeri vd., 2016). Ancak tez kapsamında YSGD ve YSSD *Enterococcus* suşlarının izole edildikleri antibiyotiklere karşı disk difüzyon ve MİK testleri hata sonuçları kabul edilebilir oranlara yakın (minör hata için % 10) bulunmuş olmasına rağmen diğer aminoglikozid grubu üyesi antibiyotiğe (YSGD'ler için streptomisin, YSSD'ler için gentamisin) karşı yüksek oranda hata vermeleri oldukça ilginç bulunmuştur.

#### **4.5. İzolatların Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR ile Araştırılması**

Tez çalışması kapsamında elde edilen izolatlarda yüksek seviyede streptomisin (*ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia* ve *aph(3')-IIIa*) ve gentamisin (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id*) direnci ile ilişkili genlerin varlığı spesifik primerler kullanılarak PZR ile araştırılmıştır. PZR denemeleri ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir. YSAD *Enterococcus* izolatlarında en sık rastlanan aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) geninin % 94.92 (56/59) ile *aph(3')-IIIa* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7). Bu geni sırasıyla % 45.76 (27/59) ile *ant(6')-Ia*, % 20.34 (12/59) ile *aph(2'')-Ic* ve % 10.17 (6/59) ile *ant(4')-Ia* izlemektedir.

**Çizelge 4.9.** YSAD *Enterococcus* suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili

Bakteriler	Aminoglikozid-modifiye edici enzim genleri							Aminoglikozid direnç profili***
	<i>aph(3')-IIIa</i> *	<i>ant(4')-Ia</i> *	<i>ant(6')-Ia</i> *	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> **	<i>aph(2'')-Ib</i> **	<i>aph(2'')-Ic</i> **	<i>aph(2'')-Id</i> **	
<i>E. faecium</i> RS12.1	+	+	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS21.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS21.2	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS21.3	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS21.4	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS25.1	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS25.2	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS25.3	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS25.4	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS25.5	+	+	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS27.1	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS27.2	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS27.3	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS27.4	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS27.5	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS27.6	+	-	-	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS29.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RS32.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RS32.2	+	-	-	-	-	-	-	S
<i>E. faecalis</i> RS32.3	+	-	+	-	-	+	-	S
<i>E. durans</i> RS32.4	+	-	+	-	-	-	-	CN, S

\* Yüksek seviyede streptomisin direnci ile ilişkili genler

\*\* Yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili genler

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

**Çizelge 4.9.** YSAD *Enterococcus* suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili (Devam)

Bakteriler	Aminoglikozid-modifiye edici enzim genleri							Aminoglikozid direnç profili***
	<i>aph(3')-IIIa</i> *	<i>ant(4')-Ia</i> *	<i>ant(6')-Ia</i> *	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> **	<i>aph(2'')-Ib</i> **	<i>aph(2'')-Ic</i> **	<i>aph(2'')-Id</i> **	
<i>E. faecalis</i> RS32.5	+	-	+	-	-	-	-	S
<i>E. faecalis</i> RS32.6	+	-	+	-	-	+	-	S
<i>E. faecium</i> RS36.1	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RS36.2	+	-	+	-	-	-	-	S
<i>E. durans</i> RS36.3	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS36.4	+	+	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS42.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS42.2	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS42.3	+	+	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS46.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS46.2	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS46.3	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS50.1	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RS62.1	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RS74.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RS74.2	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RS85.1	+	-	+	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RS88.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RG7.1	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RG20.1	-	-	-	-	-	-	-	CN
<i>E. faecium</i> RG20.2	+	-	+	-	-	-	-	CN, S

\* Yüksek seviyede streptomisin direnci ile ilişkili genler

\*\* Yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili genler

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



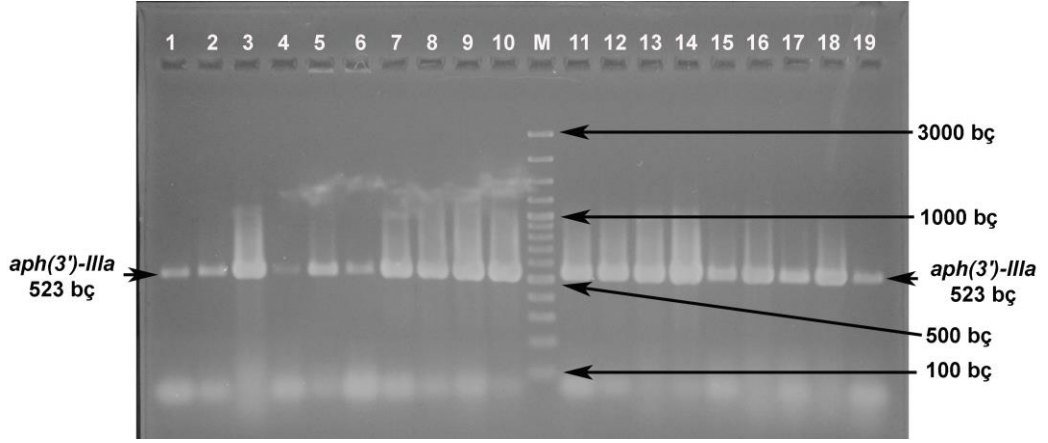
**Çizelge 4.9.** YSAD *Enterococcus* suşlarında aminoglikozid-modifiye edici enzim genlerinin varlığı ve aminoglikozid direnç profili (Devam)

Bakteriler	Aminoglikozid-modifiye edici enzim genleri							Aminoglikozid direnç profili***
	<i>aph(3')-IIIa</i> *	<i>ant(4')-Ia</i> *	<i>ant(6')-Ia</i> *	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> **	<i>aph(2'')-Ib</i> **	<i>aph(2'')-Ic</i> **	<i>aph(2'')-Id</i> **	
<i>E. faecium</i> RG20.3	+	+	-	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RG20.4	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RG22.1	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. durans</i> RG22.2	+	-	-	-	-	-	-	CN
<i>E. faecium</i> RG22.3	+	+	-	-	-	+	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RG22.4	-	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RG26.1	-	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RG26.2	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecalis</i> RG26.3	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RG36.1	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. gallinarum</i> RG46.1	+	-	+	-	-	-	-	CN, S
<i>E. gallinarum</i> RG46.2	+	-	+	-	-	-	-	CN
<i>E. faecium</i> RG52.1	+	-	-	-	-	-	-	CN, S
<i>E. faecium</i> RG52.2	+	-	-	-	-	-	-	CN
<i>E. faecium</i> RG53.1	+	-	-	-	-	-	-	CN
<i>E. faecium</i> RG53.2	+	-	-	-	-	-	-	CN
<i>E. faecium</i> RG73.1	+	-	-	-	-	-	-	CN

\* Yüksek seviyede streptomisin direnci ile ilişkili genler

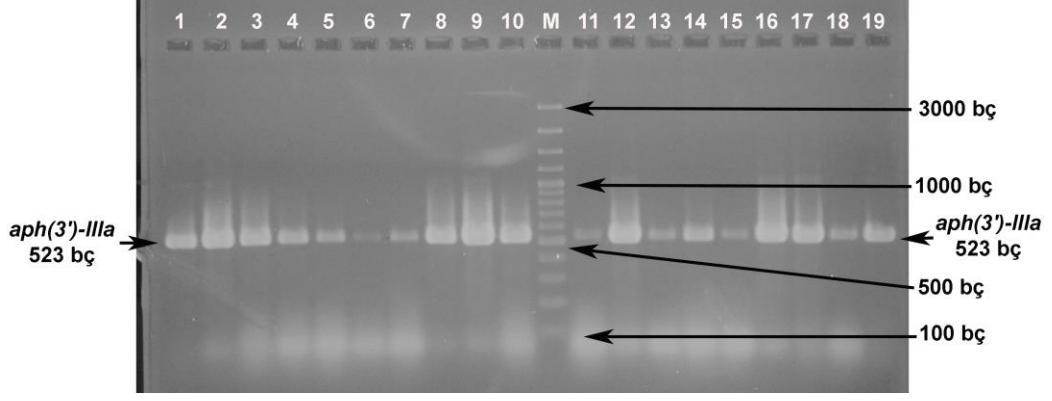
\*\* Yüksek seviyede gentamisin direnci ile ilişkili genler

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



**Şekil 4.6.** *aph(3')-IIIa* genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü

1	<i>E. faecium</i> RS12.1	: 523 bç
2	<i>E. faecalis</i> RS21.1	: 523 bç
3	<i>E. faecalis</i> RS21.2	: 523 bç
4	<i>E. faecalis</i> RS21.3	: 523 bç
5	<i>E. faecalis</i> RS21.4	: 523 bç
6	<i>E. faecalis</i> RS25.1	: 523 bç
7	<i>E. faecalis</i> RS25.2	: 523 bç
8	<i>E. faecalis</i> RS25.3	: 523 bç
9	<i>E. faecalis</i> RS25.4	: 523 bç
10	<i>E. faecalis</i> RS25.5	: 523 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
11	<i>E. faecalis</i> RS27.1	: 523 bç
12	<i>E. faecalis</i> RS27.2	: 523 bç
13	<i>E. faecalis</i> RS27.3	: 523 bç
14	<i>E. faecalis</i> RS27.4	: 523 bç
15	<i>E. faecalis</i> RS27.5	: 523 bç
16	<i>E. faecalis</i> RS27.6	: 523 bç
17	<i>E. faecalis</i> RS29.1	: 523 bç
18	<i>E. faecium</i> RS32.1	: 523 bç
19	<i>E. faecium</i> RS32.2	: 523 bç



**Şekil 4.7.** *aph(3')-IIIa* genine özgü primerlerin kullanıldığı PZR denemelerinde pozitif sonuç veren bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü

1	<i>E. faecalis</i> RS32.3	: 523 bç
2	<i>E. durans</i> RS32.4	: 523 bç
3	<i>E. faecalis</i> RS32.5	: 523 bç
4	<i>E. faecalis</i> RS32.6	: 523 bç
5	<i>E. faecium</i> RS36.1	: 523 bç
6	<i>E. faecium</i> RS36.2	: 523 bç
7	<i>E. durans</i> RS36.3	: 523 bç
8	<i>E. faecalis</i> RS36.4	: 523 bç
9	<i>E. durans</i> RS42.1	: 523 bç
10	<i>E. durans</i> RS42.2	: 523 bç
M	O'GeneRuler DNA Marker	: 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç
11	<i>E. durans</i> RS42.3	: 523 bç
12	<i>E. durans</i> RS46.1	: 523 bç
13	<i>E. durans</i> RS46.2	: 523 bç
14	<i>E. durans</i> RS46.3	: 523 bç
15	<i>E. durans</i> RS50.1	: 523 bç
16	<i>E. faecalis</i> RS62.1	: 523 bç
17	<i>E. faecium</i> RS74.1	: 523 bç
18	<i>E. faecium</i> RS74.2	: 523 bç
19	<i>E. durans</i> RS85.1	: 523 bç

Tezde elde edilen bulguların aksine, YSAD enterokoklarda AME genlerinin varlığının araştırıldığı çalışmalarda en sık rastlanan genin iki fonksiyonlu *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni olduğu bildirilmiştir (Jaimee ve Halami, 2016; Li vd., 2016; Niu vd., 2016; Ramin vd., 2017; Shete vd., 2017; Amini vd., 2018). Tez kapsamında *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* genine sadece *E. faecalis* ATCC 51299 (kontrol) suşunda rastlanılmıştır. Hiçbir YSAD *Enterococcus* izolatında *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* genine rastlanılmamış olması gıda kaynaklı enterokok izolatlarında bu genin yaygın olmadığını düşündürmektedir. Bu öngörünün kesinlik kazanması için farklı gıda örneklerinden YSAD *Enterococcus* suşlarının izole edileceği ve AME genlerinin

araştırılacağı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. AME genlerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar klinik enterokok izolatları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar YSAD *Enterococcus* izolatlarında en sık karşılaşılan AME genlerinin *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve *aph(3')-IIIa* olduğunu göstermiştir (Feizabadi vd., 2006; Khani vd., 2016; Niu vd., 2016). Tez çalışması kapsamında da çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* izolatlarında en çok karşılaşılan AME geninin *aph(3')-IIIa* olduğu tespit edilmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da *aph(3')-IIIa* geninin farklı kaynaklardan izole edilen YSGD ve YSSD *Enterococcus* izolatlarında sıklıkla tespit edildiği bildirilmiştir (Feizabadi vd., 2006; Jamet vd., 2012; Khani vd., 2016; Niu vd., 2016; Ramin vd., 2017).

Tez kapsamında YSAD *Enterococcus* izolatlarında *aph(3')-IIIa* ve *ant(6')-Ia* genlerinin sıklıkla izole edilmiş olması izolatların çoğunun streptomisine dirençli olmasından ileri geldiğini düşündürmektedir. Yüksek seviyede streptomisin direncine esas olarak *aph(3')-IIIa* ve *ant(6')-Ia* genleri aracılık etmektedir (Shaw vd., 1993; Feizabadi vd., 2006; Niu vd., 2016). Tez kapsamında *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geninin yanı sıra *aph(2'')-Ib* ve *aph(2'')-Id* genlerine de hiçbir izolatta rastlanılmamıştır. Tezde elde edilen bulgulara benzer olarak Niu vd. (2016), YSAD izolatlarının hiçbirinin *aph(2'')-Ib* geni içermediğini tespit etmiştir. Benzer bir başka çalışmada Shete vd. (2017), YSGD *Enterococcus* izolatlarının hiçbirinin *aph(2'')-Ib* ve *aph(2'')-Id* genlerini içermediğini bildirmiştir. Amini vd. (2018)'de aminoglikozid dirençli izolatların hiçbirinin *aph(2'')-Id* geni içermediğini rapor etmişlerdir.

PCR denemeleri sonucu *E. durans* RG20.1, *E. faecalis* RG22.4 ve RG26.1 izolatlarının tez çalışması kapsamında varlığı araştırılan hiçbir AME genini içermediği tespit edilmiştir. Yüksek seviyede aminoglikozid direnci öncelikli olarak AME genlerinin varlığı ile ilişkilidir (Niu vd., 2016). Ancak tez kapsamında gentamisin içeren besiyerinden izole edilen *E. durans* RG20.1, *E. faecalis* RG22.4 ve RG26.1 suşlarında varlığı araştırılan AME genlerinin hiçbirini içermemeleri bu suşlarda farklı bir direnç mekanizmasının yüksek seviyede aminoglikozid direncinden sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Benzer olarak Niu vd. (2016), bazı YSAD enterokok izolatının AME geni içermediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yüksek seviyede aminoglikozid direncinde AME genleri dışında farklı bir direnç mekanizmasının rol oynadığını düşünmüşlerdir.

39 YSSD *Enterococcus* izolatının tamamında (% 100) *aph(3')-IIIa*, % 61.54'ünde *ant(6')-Ia*, % 25.64'ünde *aph(2'')-Ic* ve % 10.26'sında *ant(4')-Ia* geni varlığı tespit edilmiştir. YSSD izolatlarında en sık karşılaşılan genotipin % 33.33 ile *aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia* ve % 30.77 ile *aph(3')-IIIa* olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Elde edilen bu bulgulara benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da yüksek seviyede streptomisin dirençli enterokok izolatlarında sıklıkla *aph(3')-IIIa* (Niu vd., 2016; Shete vd., 2017) ve *ant(6')-Ia* (Niu vd., 2016; Tyson vd., 2018) genlerinin varlığı rapor edilmiştir. Niu vd. (2016), YSSD klinik enterokok izolatlarında *aph(3')-IIIa* ve *ant(6')-Ia* genlerinin yüksek sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar 14 YSSD enterokok izolatının % 71.4'ünde *ant(6')-Ia*, % 57.1'inde *aph(3')-IIIa* ve % 50'sinde her iki genin birlikte bulunduğunu tespit etmişlerdir. Shete vd. (2017), YSSD klinik enterokok izolatlarının % 40'ının *aph(3')-IIIa* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Tyson vd. (2018), streptomisin dirençli suşların % 52'sinin *ant(6')-Ia* geni içerdiğini belirlemişlerdir.

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

AME genleri	YSSD (n= 39)
	n (%)
<i>aph(3')-IIIa</i>	12 (% 30.77)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia</i>	2 (% 5.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia</i>	13 (% 33.33)
<i>aph(3')-IIIa + aph(2'')-Ic</i>	1 (% 2.56)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia</i>	2 (% 5.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ic</i>	9 (% 23.08)

20 YSGD *Enterococcus* izolatlarının % 60'mının *aph(3')-IIIa*, % 15'inin *aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia* ve % 10'unun *aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aph(2'')-Ic* genotipine sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Yüksek seviyede gentamisin direncinin *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* ve/veya *aph(3')-IIIa* genleri ile ilişkili olduğu farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Feizabadi vd., 2006; Khani vd., 2016; Niu vd., 2016). Feizabadi vd. (2006), Khani vd. (2016) ve Niu vd. (2016) klinik YSGD enterokok izolatlarında *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve *aph(3')-IIIa* genlerinin sıklıkla bulunduğunu bildirmişlerdir. Niu vd. (2016), klinik YSGD enterokok izotlarında en sık karşılaşılan AME genlerinin % 85.3 ile *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, % 25 ile *aph(3')-IIIa*, % 21.4 ile

*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* + *aph(3')-IIIa* genleri olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, YSGD izolatlarının *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genlerini de içerdiğini saptamışlardır.

**Çizelge 4.11.** YSGD *Enterococcus* izolatlarının AME genotip yüzdeleri (%)

AME genleri	YSGD (n= 20)
	n (%)
<i>aph(3')-IIIa</i>	12 (% 60)
<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(6')-Ia</i>	3 (% 15)
<i>aph(3')-IIIa</i> + <i>ant(4')-Ia</i> + <i>aph(2'')-Ic</i>	2 (% 10)

YSAD *E. faecalis* izolatlarında en sık rastlanan AME geni profilinin % 53.85 (14/26) ile *aph(3')-IIIa* geni olduğu tespit edilmiştir. *E. faecium* izolatlarında en sık karşılaşılan AME geni profilinin % 44.44 (8/18) ile *aph(3')-IIIa* ve % 33.33 (6/18) ile *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* olduğu saptanmıştır. *E. durans* izolatlarında *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* + *aph(2'')-Ic* ve *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* genlerinin en sık karşılaşılan AME geni profili oldukları belirlenmiştir. Her iki *E. gallinarum* izolatının da *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* AME geni profiline sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). *Enterococcus* türlerinin AME geni profilleri ve dağılımları yüksek seviyede streptomisin ve gentamisin direncine göre ayrı ayrı değerlendirildiği zaman 21 YSSD *E. faecalis* izolatlarının 6 farklı AME geni profiline sahip olduğu ve en sık karşılaşılan profilin % 52.38 (11/21) ile *aph(3')-IIIa* olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13). 5 YSGD *E. faecalis* izolatının ise tamamının *aph(3')-IIIa* AME geni profili gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). 8 YSSD *E. faecium* izolatında en sık karşılaşılan AME geni profili % 62.5 ile (5/8) *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* iken 10 YSGD *E. faecium* izolatında % 70 ile (7/10) *aph(3')-IIIa* geni bulunmuştur (Çizelge 4.13 ve 4.14). 10 YSSD *E. durans* izolatında *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* + *aph(2'')-Ic* ve *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* AME geni profili en sık (sırasıyla % 50 ve % 40) karşılaşılan profiller iken YSGD *E. durans* izolatlarının tamamının *aph(3')-IIIa* AME geni profiline sahip oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.13 ve 4.14). Tezde elde edilen bulgulara benzer olarak Niu vd. (2016), YSSD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının *ant(6')-Ia* (% 71.4), *aph(3')-IIIa* (% 57.1) ve *aph(3')-IIIa* + *ant(6')-Ia* (% 50) AME geni profiline sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ancak tezde elde edilen bulguların aksine araştırmacılar YSGD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında tespit ettikleri 12 farklı AME geni

profilinin tamamının *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni içerdiğini saptamışlardır. Benzer olarak Shete vd. (2017), YSSD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının *aph(3')-IIIa* geni içerirken, YSGD *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni içerdiğini bildirmişlerdir.



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

AME genleri	<i>E. faecalis</i> (n= 26)	<i>E. faecium</i> (n= 18)	<i>E. durans</i> (n= 13)	<i>E. gallinarum</i> (n= 2)	Toplam (n= 59)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>aph(3')-IIIa</i>	14 (% 53.85)	8 (% 44.44)	2 (% 15.39)	-	24 (% 40.68)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia</i>	1 (% 3.85)	1 (% 5.56)	-	-	2 (% 3.39)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia</i>	4 (% 15.38)	6 (% 33.33)	4 (% 30.77)	2 (% 100)	16 (% 27.12)
<i>aph(3')-IIIa + aph(2'')-Ic</i>	1 (% 3.85)	-	-	-	1 (% 1.70)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia</i>	1 (% 3.85)	-	1 (% 7.69)	-	2 (% 3.39)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aph(2'')-Ic</i>	-	2 (% 11.11)	-	-	2 (% 3.39)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia + aph(2'')-Ic</i>	3 (% 11.54)	1 (% 5.56)	5 (% 38.46)	-	9 (% 15.25)

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

AME genleri	<i>E. faecalis</i> (n= 21)	<i>E. faecium</i> (n= 8)	<i>E. durans</i> (n= 10)	Toplam (n= 39)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>aph(3')-IIIa</i>	11 (% 52.38)	1 (% 12.5)	-	12 (% 30.77)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia</i>	1 (% 4.76)	1 (% 12.5)	-	2 (% 5.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia</i>	4 (% 19.05)	5 (% 62.5)	4 (% 40)	13 (% 33.33)
<i>aph(3')-IIIa + aph(2'')-Ic</i>	1 (% 4.76)	-	-	1 (% 2.56)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + ant(6')-Ia</i>	1 (% 4.76)	-	1 (% 10)	2 (% 5.13)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aph(2'')-Ic</i>	3 (% 14.29)	1 (% 12.5)	5 (% 50)	9 (% 23.08)

**Çizelge 4.14.** YSGD *Enterococcus* türlerinin aminoglikozid-modifiye edici enzim geni profilleri ve dağılımları

AME genleri	<i>E. faecalis</i> (n= 5)	<i>E. faecium</i> (n= 10)	<i>E. durans</i> (n= 3)	<i>E. gallinarum</i> (n= 2)	Toplam (n= 20)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>aph(3')-IIIa</i>	3 (% 60)	7 (% 70)	2 (% 66.67)	-	12 (% 60)
<i>aph(3')-IIIa + ant(6')-Ia</i>	-	1 (% 10)	-	2 (% 100)	3 (% 15)
<i>aph(3')-IIIa + ant(4')-Ia + aph(2'')-Ic</i>	-	2 (% 20)	-	-	2 (% 10)



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) *Enterococcus* türlerinin izolasyonu için Isparta ve Antalya illerinden temin edilen toplam 100 çiğ süt (10) ve süt ürünleri (70 peynir, 10 tereyağı ve 10 yoğurt) örnekleri kullanılmıştır. YSAD *Enterococcus* varlığının araştırıldığı örnek grupları içerisinde yalnız çiğ süt ve peynir örneklerinde YSAD *Enterococcus* varlığına rastlanılmıştır. İzolasyon materyali olarak kullanılan hiçbir yoğurt ve tereyağı örneğinde koloni gelişimi gözlenmemiştir.

İzole edilen toplam 59 YSAD *Enterococcus* suşunun 54'ü (% 91.53) peynir örneklerinden izole edilmiştir. Söz konusu izolatların 15'i YSGD ve 39'u ise YSSD bulunmuştur. Tez kapsamında kullanılan 70 peynir örneğinin sadece 22'sinde koloni gelişimi gözlenmiştir. Peynir örneklerinde YSAD *Enterococcus* izolasyon sıklığı % 31.43 (22/70) olarak hesaplanmıştır. Geri kalan 5 YSAD *Enterococcus* kolonisi ise 2 çiğ süt örneğinden izole edilmiştir. Çiğ süt örneklerinde YSAD *Enterococcus* izolasyon sıklığı % 20 (2/10) olarak bulunmuştur. Çiğ süttten izole edilen suşların tamamı YSGD bulunmuştur.

*Enterococcus* türlerine özgü primerler ve 16S rDNA dizi analizi sonucu 59 YSAD *Enterococcus* suşunun 26'sı *E. faecalis* (% 44.07), 18'i *E. faecium* (% 30.51), 13'ü *E. durans* (% 22.03) ve 2'si *E. gallinarum* (% 3.39) olarak tanımlanmıştır.

Disk difüzyon testi sonucu YSAD *Enterococcus* izolatlarının 1 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar arasında en geniş antibiyotik direnç profiline sahip suşun *E. faecium* RS12.1 olduğu belirlenmiştir. 20 YSGD *Enterococcus* izolatının disk difüzyon testi sonucu 18'inin gentamisine dirençli ve 2'sinin (*E. faecium* RG36.1 ve RG53.2) orta seviyede dirençli olduğu belirlenmiştir. 39 YSSD *Enterococcus* izolatlarının ise 33'ü streptomisine dirençli ve 6'sı (*E. faecalis* RS21.3, RS21.4, RS36.4, *E. durans* RS42.1, RS42.2 ve RS42.3) orta seviyede dirençli bulunmuştur. YSAD *Enterococcus* izolatlarının en duyarlı olduğu antibiyotiğin teikoplanin, en dirençli oldukları antibiyotiğin ise tetrasiklin olduğu saptanmıştır. İzolatlar arasında antibiyotiklere en dirençli türün *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir. YSAD

*Enterococcus* suşlarının aminoglikozid grubu antibiyotiklerin yanı sıra klinik olarak öneme sahip antibiyotiklere de direnç göstermesi tüketici sağlığı açısından endişe uyandırıcıdır.

59 YSAD *Enterococcus* izolatının 57'sinin (% 94.92) 2 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların % 89.83'ü (53/59) çoklu antibiyotik direncine (en az üç antibiyotiğe karşı dirençli) sahip bulunmuştur.

YSAD *Enterococcus* izolatlarının streptomisin ve gentamisin antibiyotiklerine karşı MİK değerlerinin 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. MİK testi sonucu YSSD izolatlarının tamamı streptomisine, YSGD izolatlarının tamamı ise gentamisine dirençli bulunmuştur (MİK  $\geq$ 4096 µg/mL). Aynı zamanda YSSD izolatlarının % 87.18'inin gentamisine ve YSGD izolatlarının ise % 65'inin streptomisine karşı yüksek seviyede dirence sahip olduğu belirlenmiştir. 59 YSAD *Enterococcus* izolatının 47'sinin (% 79.66) hem YSSD hem de YSGD oldukları tespit edilmiştir.

YSAD *Enterococcus* izolatlarında en sık rastlanan AME geninin % 94.92 (56/59) ile *aph(3')-IIIa* olduğu tespit edilmiştir. Bu geni sırasıyla % 45.76 (27/59) ile *ant(6')-Ia*, % 20.34 (12/59) ile *aph(2'')-Ic* ve % 10.17 (6/59) ile *ant(4')-Ia* geninin izlediği belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib* ve *aph(2'')-Id* genlerine rastlanılmamıştır. PZR denemeleri sonucu *E. durans* RG20.1, *E. faecalis* RG22.4 ve RG26.1 izolatlarının tez çalışması kapsamında varlığı araştırılan hiçbir AME genini içermediği tespit edilmiştir. Söz konusu suşlarda AME geni varlığının tespit edilmemiş olması bu suşlarda farklı bir direnç mekanizmasının yüksek seviyede aminoglikozid direncinden sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

Antibiyotik direnç son yıllarda enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunu oluşturmaktadır. Aminoglikozid grubu üyesi gentamisin ve streptomisin enfeksiyonların tedavisinde kullanılan hayati öneme sahip ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Son 10 yılda farklı ülkelerde yapılan çalışmalar ile çeşitli kaynaklardan izole edilen enterokok izolatlarının yüksek seviyede aminoglikozid direncine sahip oldukları gösterilmiştir. Ülkemiz açısından bir ilk niteliği taşıyan bu

tez çalışması sonucu elde edilen bulgular tüketici sağlığı açısından endişe uyandırıcıdır. Çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* suşları AME genlerinin kommensal ve patojen bakterilere aktarımı/yayılması için rezervuar görevi görebilecek olmasından dolayı endişe uyandırıcıdır. Devam niteliğinde yapılacak yeni çalışma/çalışmalar ile çiğ süt ve peynir örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* suşlarının patojenitesinde etkili olan virülens faktör genlerinin de araştırılması gerekmektedir. Elde edilen veriler söz konusu izolatların tüketici sağlığı açısından taşıdığı riskleri ortaya koyacak olmasından dolayı önem arz etmektedir. Ayrıca, gelecek yıllarda yapılacak çalışmalar ile farklı hayvansal kaynaklı gıda örneklerinde yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokok türlerinin yaygınlığının ve tüketici sağlığı açısından risk teşkil eden virülens fakörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması gerekmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000. Comparison of Antimicrobial Resistance Phenotypes and Resistance Genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Humans in the Community, Broilers, and Pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 37, 127-137.
- Acar, J.F., Goldstein, F.W., 1997. Trends in Bacterial Resistance to Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 24(1), 567-573.
- Agarwal, J., Kalyan, R., Singh, M., 2009. High-level aminoglycosideresistance and beta-lactamase production in enterococci at a tertiary care hospital in India. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62, 158-159.
- Akdemir, Y., 2010. Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnç Profilinin Saptanması. Afyonkocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 91 Sayfa, Afyonkarahisar.
- Akers, K.S., Chaney, C., Barsoumian, A., Beckius, M., Zera, W., Yu, X., Guymon, C., Keen III, E.F., Robinson, B.J., Mende, K., Murray, C.K., 2010. Aminoglycoside Resistance and Susceptibility Testing Errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48(4), 1132-1138.
- Akpınar Kankaya, D., Özden Tuncer, B., Tuncer, Y., 2016. Gıda Kaynaklı Enterokokların Potansiyel Risk Faktörleri. *Gıda*, 42(1), 8-19.
- Akpınar Kankaya, D., 2017. Hayvansal Gıdalardan izole Edilen Vankomisin Dirençli *Enterococcus*, *Pediococcus* ve *Weissella* Suşlarının Potansiyel Risk Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 213 sayfa, Isparta.
- Akçam, F.Z., Gönen, İ., Kaya, O., Yaylı, G., 2004. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Enterobakterilerde Beta-Laktam Antibiyotiklere Duyarlılık ve ESBL Sıklığının Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 11(1), 6-9.
- Akgül, Ö., Gülhan, T., Güdücüoğlu, H., 2016. Tavuk ve Martı Kökenli Enterokok Türlerinin Antibiyotik Dirençliliğinin Fenotipik ve Genotipik Analizi. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 63, 235-244.
- Akoğlu, A., Yaman, H., Coşkun, H., Sarı, K., 2017. Mengen Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu, Moleküler Tanımlanması ve Bazı Starter Kültür Özelliklerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel University Journal of Natural and Applied Sciences*, 21(2), 453-459.

- Alp, D., 2013. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlilikleri ve Aroma Madde Oluşturma Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 70 sayfa, Isparta.
- Amini, F., Krimpour, H.A., Ghaderi, M., Vaziri, S., Ferdowsi, S., Azizi, M., Amini, S., 2018. Prevalence of Aminoglycoside Resistance Genes in *Enterococcus* Strains in Kermanshah, Iran. Iranian Journal of Medical Sciences, 43(5), 487-493.
- Andriole, V.T., 2005. The Quinolones: Past, Present, and Future. Clinical Infectious Diseases, 41, 113-119.
- Arbeloa, A., Segal, H., Hugonnet, J.E., Josseume, N., Dubost, L., Brouard, J.P., Gutmann, L., Mengin-Lecreulx, D., Arthur, M., 2004. Role of Class a Penicillin-Binding Proteins in PBP5-Mediated Beta-Lactam Resistance in *Enterococcus faecalis*. Journal of Bacteriology, 186(5), 1221-1228.
- Arizcun, C., Barcina, Y., Torre, P., 1997. Identification and Characterization of Proteolytic Activity of *Enterococcus* spp. Isolated from Milk and Roncal and Idiaza Bal Cheese. International Journal of Food Microbiology, 38, 17-24.
- Aslan, S., 2011. Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokokların Tiplendirilmesi Vankomisin ve Yüksek Düzey Aminoglikozid Direncinin Araştırılması. Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 81 sayfa, Mersin.
- Avcı, M., Özden Tuncer, B., 2017. Safety Evaluation of Enterocin Producer *Enterococcus* spp. Strains Isolated from Traditional Turkish Cheeses. Polish Journal of Microbiology, 66(2), 223-233.
- Avent, M.L., Rogers, B.A., Cheng, A.C., Paterson, D.L., 2011. Current Use of Aminoglycosides: Indications, Pharmacokinetics and Monitoring for Toxicity. Internal Medicine Journal, 41, 441-449.
- Bağcıgil, A.F., İkiz, S., Ak, S. ve Özgür, N., 2015. Isolation of Vancomycin Resistant Enterococci from Animal Faeces, Detection of Antimicrobial Resistance Profiles and Vancomycin Resistant Genes. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21, 87-94.
- Baylan, O., Nazik, H., Bektöre, B., Çitil, B.E., Turan, D., Öngen, B., Özyurt, M., Açıkel, C.H., Haznedaroğlu, T., 2011. The Relationship Between Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Urinary *Enterococcus* Isolates. Mikrobiyoloji Bülteni, 45(3), 430-444.
- Belicová, A., Križková, L., Krajcovic, J., Jurkovic, D., Sojka, M., Ebringer, L., Dušínský, R., 2007. Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus* Species Isolated from Slovak Bryndza Cheese. Folia Microbiologica, 52(2), 115-119.

- Berthold, P., Schmitt, R., Mages, W., 2002. An Engineered *Streptomyces hygroscopicus aph 7*" Gene Mediates Dominant Resistance Against Hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153, 401-412.
- Berzeg, D., 2005. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ve E Test ile Vankomisin MİK Değerlerinin Değerlendirilmesi. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, 96 Sayfa, İstanbul.
- Bismuth, R, Courvalin P. 2010. Aminoglycosides and Gram-Positive Bacteria: Antibioqram, 3rd edn. ESKA, Portland.
- Bouymajane, A., Filali,F.R., Oulghazi, S., Ed-dra, A., Benhallam, F., El Allaoui, A., Anissi, J., Sendide, K., Ouhmidou, B., Moumni, M., 2018. Occurrence, Molecular and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* spp. Isolated from Raw Cow's Milk Trade by Street Trading in Meknes City, Morocco. *GERMS*, 8(2), 77-84.
- Bozdoğan, B., Berrezouga, L., Kuo, M., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq, R., 1999. a New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 925-929.
- Bozkurt, İ., Leblebicioğlu, H., 2015. Hayvanlarda Oluşan Antibiyotik Direncinin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 1(2):76-82.
- Butaye, P., Van Damme, K., Devriese, L.A., Van Damme, L., Baele, M., Lauwers, S., Haesebrouck, F., 2000. *In Vitro* Susceptibility of *Enterococcus faecium* Isolated from Food to Growth-Promoting and Therapeutic Antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 181-187.
- Büyükkaya Kayış, F., 2014. Gölbaşı ve Azaplı Göllerinin (Adıyaman) Mikrobiyolojik Kalitesi ve İzolatların Antibiyotik Dirençlilik Özelliklerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 144 sayfa, Adana.
- Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E., 1992. Rapid Genomic Fingerprinting of *Lactococcus lactis* Strains by Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction with 32P and Fluorescent Labels. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1772-1775.
- Callewaert, R., Hugas, M., De Vuyst, L., 2000. Competitiveness and Bacteriocin Production of *Enterococci* in the Production of Spanish-Style Dry Fermented Sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 33-42.

- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., 2008. Occurrence of Virulence Factors and Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Collected from Dairy and Human Samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Łaniewska-Tronkenheim, Ł., 2017. Virulence Factor of *Enterococcus* spp. Presented in Food. *LWT Food Science and Technology*, 75, 670-676.
- Chow, J.W., 2000. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. *Clinical Infectious Diseases*, 31, 586-589.
- Cocconcelli, P. S., Cattivelli, D. and Gazzola, S. 2003. Gene Transfer of Vancomycin and Tetracycline Resistances among *Enterococcus faecalis* During Cheese and Sausage Fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 315-323.
- Coppola, S., Villani, F., Parente, E., 1990. Comparison of Different Starter Systems for Water- Buffalo Mozzarella Cheese Manufacture. *Le Lait*, 70, 411-423.
- CLSI, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22th Informational Supplement M100-S-22 NCCLS. Pennsylvania: Wayne, United States of America.
- Çaylan, R., Üstünakın, M., Kadımov, V., Aydın, K., Köksal, İ., 2004. Fekal ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34, 24-28.
- Çepoğlu, H., Adıgüzel, M.C., Bağcıgil, A.F., Ak, S., 2016. Tavuklarda Vankomisin Dirençli Enterokokların ve Vankomisin Direnci ile İlişkili Genlerin Dağılımının Araştırılması. *Journal of Anatolian Environmental&Animal Sciences*, 3, 92-95.
- Çetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., 2000. Vancomycin Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 686-707.
- Çıtak, S., Yücel, N., Orhan, S., 2004. Antibiotic Resistance and Incidence of *Enterococcus* Species in Turkish White Cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 27-31.
- Çiftçi, İ.H., Aşık, G., 2011. *Acinetobacter Baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Ankem Dergisi*, 25(3), 196-207.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
- Demirel, Y.N., Gürler, Z., 2016. Hayvansal Gıdalardan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Profilleri. *Kocatepe Veterinary Journal*, 9(4), 372-378.

- Demirgöl, F., 2015. Sucuktan Enterokokların İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 86 sayfa, Isparta.
- Demirgöl ve Tuncer, 2017. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37(5), 670-68.
- Devriese, L.A., Pot, B., 1995. The Genus *Enterococcus*. Erişim tarihi: 14.11.2018. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5817-0\\_10](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5817-0_10).
- De Vuyst, L.; 2000. Technology Aspects Related to The Application of Functional Starter Cultures. Food Technology Biotechnology, 38(2), 105-112.
- De Vuyst, L.; Moreno, M., R.; Revets, H.; 2003. Screening for Enterocin and Detection of Hemolysin and Vancomycin Resistance in Enterococci of Different Origins. International Journal of Food Microbiology, 84, 299-318.
- Dilik, Z., İstanbulluoğlu, E., 2010. Entansif Broyler İşletmeleri İle Kırsal Tavukçuluk İşletmelerinden İzole Edilen Enterokokların Fenotipik ve Genotipik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar. Bornova Veteriner Kontrol Ve Araştırma Enstitüsü Dergisi, 32(46), 37-46.
- Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W., 2003. Methods used for the Isolation, Enumeration, Characterisation and Identification of *Enterococcus* spp. Media for Isolation and Enumeration. International Journal of Food Microbiology, 88, 147-164.
- Doyle, M.E., 2001. Alternatives to Antibiotic Use for Growth Promotion in Animal Husbandry. Food Research Institute, University of Wisconsin, 17.
- Dinç, G., Ata, Z., Temelli, S., 2012. Sığır Mastisitlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Aktivitesi ve Antibiyotik Dirençlilik Profilinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 59, 85-88.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C., 1989. Isolation and Direct Complete Nucleotide Determination of Entire Genes. Characterization of a Gene Coding for 16S Ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 17, 7843-7853.
- El-Din, B., El-Soda, M., Ezzat, N., 2002. Proteolytic, Lipolytic and Autolytic Activities of *Enterococci*. Lait, 82, 289-304.
- El-Ghazawy, I.F., Okasha, H.A.S., Mazloun, S.M., 2016. A Study of High Level Aminoglycoside Resistant Enterococci. African Journal of Microbiology Research, 10(16), 572-577.



- Emborg, H.D., Anderson, J.S., Seyfarth, A.M., Boel, J. and Weneger, H.C. 2003. Relations between The Occurance of Resistance to Antimicrobial Growth Promoters among *Enterococcus faecium* Isolated from Broilers and Broiler Meat. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 273-284.
- Erbek, S., Özakin, C., Gedikoğlu, S., 2002. Enterokok Suşlarında Saptanan Yüksek Düzeyli Aminoglikozid ve Glikopeptid Direnci. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 6, 142-149.
- Ertek, M., Yazgı, E., Özkurt, Z., Uyanık, M.H., Aktaş, O., 2003. Hastane İzolatlarında Aminoglikozid Direnci. *Ankem Dergisi*, 17(4), 400-404.
- Ertürkmen, P., 2015. Beyaz Peynir Üretimi İçin Starter Kültür İzolasyonu ve Bu Kültürlerin Peynirin Özellikleri Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 121 sayfa, Isparta.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (EUCAST) Breakpoint Tables for Interpretation of MIC's and Zone Diameters. Version 8.1, Valid from 2018-05-15.
- Fard, R.M.N., Heuzenroeder, M.W., Barton, M.D., 2011. Antimicrobial and Heavy Metal Resistance in Commensal Enterococci Isolated from Pigs. *Veterinary Microbiology*, 148, 276-282.
- Feizabadi, M.M., Maleknejad, P., Asgharzadeh, A., Asadi, S., Shokrzadeh, L., Sayadi, S., 2006. Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes Genes among Isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. *Microbial Drug Resistance Journal*, 12, 265-268.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The Role and Application of Enterococci in Food and Health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Franklin, K., Clarke, A.J., 2001. Overexpression and Characterization of the Chromosomal Aminoglycoside 29-N-Acetyltransferase of *Providencia stuartii*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 45(8), 2238-2244.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the Crossroads of Food Safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H., 2003. Enterococci in foods-A Conundrum for Food Safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122.

- Fuka, M.M., Maksimovic, A.Z., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., Schloter, M., 2017. Characterization of Enterococcal Community Isolated from an Artisan Istrian Raw Milk Cheese: Biotechnological and Safety Aspects. *Food Technoogy and Biotechnology*, 55(3) 368–380.
- Galindo-Cuspinera, V., Westhoff, D.C., Rankin, S.A., 2003. Antimicrobial Properties of Commercial Annatto Extracts against Selected Pathogenic, Lactic Acid, and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Protection*, 66(6), 1074-1078.
- Garrido, A.M., Gálvez, A., Pulido, R.P., 2014. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *The Journal Infectious Diseases*, 2, 1-7.
- Gawryszewska, I., Malinowska, K., Kuch, A., Chrobak-Chmiel, D., Laniewska-Trokenheim, L., Hryniewicz, W., Sadowy, E., 2017. Distribution of Antimicrobial Resistance Determinants, Virulence-Associated Factors and Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats Loci in Isolates of *Enterococcus faecalis* from Various Settings and Genetic Lineages. *Pathogens and Disease*, 75(2), 1-12.
- Giménez-Pereira, M.L., 2005. Enterococci in Milk Product. Massey University, Veterinerlik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 152 sayfa, New Zealand.
- Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E., 1997. Enterococci Isolated from Dairy Products: a Review of Risks and Potential Technological Use. *Journal of Food Protection*, 60(6), 732-738.
- Giraffa, G.; Olivari, A., M.; Neviane., 2000. Isolation of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* from Italian Cheeses. *Food Microbiology*, 17, 671-677.
- Giraffa, G., 2002. Enterococci from Foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of Enterococci in Dairy Products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Gökalp, F., 2015. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (Gsbl) Üreten Enterobacteriaceae Türlerinin Sütlerdeki Prevelansı ve Antibiyotik Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi. İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Güvenliği ve Beslenme Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 69 sayfa, İstanbul.
- Guessas, B.; Kihal, M.; 2004. Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Arid Zone Raw Goat's Milk. *African Journal of Biotechnology*, 3(6), 339-342.
- Gülmez, M.; Güven, A., 2002. Probiyotik, Prebiyotik ve Sinbiyotikler. *Kafkas Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 8(1), 83-89.

- Hashem, Y.A., Yassin, A.S., Amin, M.A., 2015. Molecular Characterization of *Enterococcus* spp. Clinical Isolates from Cairo, Egypt. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(5), 80-86.
- Hayes, J.R., English, L.L., Carter, P.J., Proescholdt, T., Lee, K.Y., Wagner, D.D., White, D.G., 2003. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7153-7160.
- Hidalgo del Rio, L., 2013. Identification and Characterization of an Emergent Aminoglycoside Resistance Mechanism the 16S rRNA Methyltransferases. *Universidad Complutense De Madrid, Facultad De Veterinaria, Doktora Tezi*, 157 Sayfa, Madrid.
- Hope, R., Mushtaq, S., James, D., Pillana, T., Warner, M., Livermore, D.M., 2010. Tigecycline Susceptibility Testing Group. Tigecycline Activity: Low Resistance Rates But Problematic Disc Breakpoints Revealed by a Multicentre Sentinel Survey in the UK. *Journal Antimicrobial Chemother*, 65, 2602-2609.
- Hoşgör, M., 1996. Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi*, 51 sayfa, İzmir.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2003. Functionality of Enterococci in Meat Products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 223-233.
- Huycke, M.M., Sahn, D.F., Gilmore, M.S., 1998. Multiple Drug Resistant Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 4(2), 239-249.
- İnoğlu, Z., Tuncer, Y., 2013. Safety Assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Journal of Food Safety*, 33, 369-377.
- İşeri, L., Şahin, E., Dolapçı, İ., Yürüken, Z., 2016. Minimum Inhibitory Concentration Values and Problematic Disk Break Points of Tigecycline Against Vancomycin and/or High-Level Aminoglycoside-Resistant Enterococci. *Alexandria Journal of Medicine*, 52, 125-129.
- İşleröğlü, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., 2008. Enterokoklar: Biyokimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri ile Patojenitesi. *Akademik Gıda*, 6(3), 16-26.
- Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3558-3565.

- Jackson, C.R., Lombard, J.E., Dargatz, D.A., Fedorka-Cray, P.J., 2010. Prevalence, Species Distribution and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from US Dairy Cattle. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 41-48.
- Jaglic, Z., Vlkova, H., Bardon, J., Michu, E., Cervinkova, D., Babak, V., 2012. Distribution, Characterization and Genetic Bases of Erythromycin Resistance in Staphylococci and Enterococci Originating from Livestock. *Zoonoses and Public Health*, 59, 202-211.
- Jaimee, G., Halami, P.M., 2016. High-Level Aminoglycoside Resistance in *Enterococcus*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* Species from Farm Animals and Commercial Meat Products. *Annals of Microbiology*, 66, 101-110.
- Jain, S., Kumar, A., Kashyap, B., Kaur, I.R., 2011. Clinico-Epidemiological Profile and High-Level Aminoglycoside Resistance in Enterococcal Septicemia from a Tertiary Care Hospital in East Delhi. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 1, 80-83.
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M.A., Chamba, J.F., Bertrand, X., Serror, P., 2012. Prevalence and Characterization of Antibiotic Resistant *Enterococcus faecalis* in French Cheeses. *Food Microbiology*, 31, 191-198.
- Jana, S., Deb, J.K., 2006. Molecular Understanding Of Aminoglycoside Action and Resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 140-150.
- Jensen, L.B., Frimodt-Møller, N., Aarestrup, F.M., 1999. Presence of *erm* Gene Classes in Gram-Positive Bacteria of Animal and Human Origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 151-158.
- Jones, R.N., Della Latta, P., Lee, L.V., Biedenbach, D.J., 2002. Linezolid-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from a Patient without Prior Exposure to an Oxazolidinone: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42(2), 137-139.
- Jung, Y.H., Shin, E.S., Kim, O., Yoo, J.S., Lee, K.M., Yoo, J.I., Chung, G.T., Lee, Y.S., 2010. Characterization of Two Newly Identified Genes, *vgaD* and *vatG*, Conferring Resistance to Streptogramin a in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4744-4749.
- Jyothi, P., Metri, B., Peerapur, B., 2014. High Level Resistance to Aminoglycosides in Urinary Isolates of Enterococci. *Annals of Medical and Health Science Research*, 4(1), 58-59.
- Kajihara, T., Nakamura, S., Iwanaga, N., Oshima, K., Takazono, T., Miyazaki, T., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Kohno, N., Kohno, S., 2015. Clinical Characteristics and Risk Factors of Enterococcal Infections in Nagasaki, Japan: a Retrospective Study. *BMC Infectious Diseases*, 15, 426- 504.
- Kalina, A.P., 1970. The Taxonomy and Nomenclature of *Enterococci*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 20, 185-189.

- Karakaş, A., 2005. Beyaz Peynir ve Fermente Sucuklardan *Enterococcus faecium*'un İzolasyonu ve Tanımlanması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 82 sayfa, Adana.
- Khani, M., Fatollahzade, M., Pajavand, H., Bakhtiari, S., Abiri, R., 2016. Increasing Prevalence of Aminoglycoside-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolates Due to the *aac(6')-aph(2'')* Gene: A Therapeutic Problem in Kermanshah, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 9(3), 1-5.
- Kılıç, D., 2004. Antibiotic Use in Animal Feeding and Antimicrobial Resistance. Flora Dergisi, 9(1), 29-36.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., Witte, W., 2003. Occurrence and Spread of Antibiotic Resistances in *Enterococcus faecium*. International Journal of Food Microbiology, 88, 269-290.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and Physiology of Probiotic Lactic Acid Bacteria. International Journal of Food Microbiology, 41, 103-125.
- Klein, G., 2003. Taxonomy, Ecology and Antibiotic Resistance of Enterococci from Food and Gastro-Intestinal Tract. International Journal of Food Microbiology, 88, 123-131.
- Koç, F., 2009. İshalli Çocukların Dışkılarından İzole Edilen Enterokoklarda Vankomisin Direnci ve Yüksek Düzeyde Aminoglikozid Direncinin Araştırılması. Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 69 sayfa, Kırıkkale.
- Kristich, C.J., Little, J.L., Hall, C.L., Hoff, J.S., 2011. Reciprocal Regulation of Cephalosporin Resistance in *Enterococcus faecalis*. mBio, 2 (6), e00199-11.
- Kristich, C.J., Rice, L.B., Arias, C.A., 2014. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Eds.). Enterococci: from Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/> (Erişim tarihi Ekim 2018).
- Kühn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A.F., Blanch, A.R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M.A., Dominguez, L., Herrero, I.A., Möllby, R., 2003. Comparison of Enterococcal Populations in Animals, Humans, and the Environment - a European Study. International Journal of Food Microbiology, 88, 133-145.
- Lan, YF., Zhang, Li, K., Huang, SC., Rehman, M.U., Zhang, LH., Luo, HQ., Wang, L., Han, ZQ., Shahzad, M., Li, JK., 2016. Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistant Enterococci Isolated from Tibetan Pigs. Pakistan Veterinary Journal, 36(4), 503-505.

- Leclercq, R., 1997. Enterococci Acquire New Kinds of Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 80-84.
- Li, W., Li, J., Wei, Q., Hu, Q., Lin, X., Chen, M., Ye, R., Lv, H., 2015. Characterization of Aminoglycoside Resistance and Virulence Genes among *Enterococcus* spp. Isolated from a Hospital in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 3014-3025.
- Linaje, R., Coloma, M., D., Perez-Martinez, G., Zuniga, M., 2004. Characterization of Faecal Enterococci from Rabbits for the Selection of Probiotic Strains. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 761-771.
- Liu, J.W., Ko, W.C., Huang, C.H., Liao, C.H., Lu, C.T., Chuang, Y.C., Tsao, S.M., Chen, Y.S., Liu, Y.C., Chen, W.Y., Jang, T.N., Lin, H.C., Chen, C.M., Shi, Z.Y., Pan, S.C., Yang, J.L., Kung, H.C., Liu, C.E., Cheng, Y.J., Chen, Y.H., Lu, P.L., Sun, W., Wang, L.S., Yu, K.W., Chiang, P.C., Lee, M.H., Lee, C.M., Hsu, G.J., Hsueh, P.R., 2012. Agreement Assessment of Tigecycline Susceptibilities Determined by the Disc Diffusion and Broth Micro Dilution Methods among Commonly Encountered Resistant Bacterial Isolates: Results from the Tigecycline *In Vitro* Surveillance in Taiwan (TIST) Study, 2008 to 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1414-1417.
- Lukasova, J., Sustackova, A., 2003. Enterococci and Antibiotic Resistance. *Acta Veterinaria Brno*, 72, 315-323.
- Malathum, K., Murray, B.E., 1999. Vancomycin Resistant Enterococci. *Drug Resistance Updates*, 2, 224-243.
- Manero, A., Blanch, A.R., 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4425-4430.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Uden, G., 2006. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910-938.
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.
- Mendiratta, D.K., Kaur, H., Deotale, V., Thamke, D.C., Narang, R., Narang, P., 2008. Status of High Level Aminoglycoside Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in a Rural Hospital of Central India. *Indian Journal of Microbiology*, 26, 369-371.
- Meriç, M., Rüzgar, M., Gündeş, S., Willke, A., 2004. Hastanede Yatan Hastalardan İzole Edilen Enterokok Türleri ve Antibiyotiklere Direnç Durumu. *ANKEM Dergisi*, 18(3), 141-144.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., Tulkens, P.M., 1999. Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 727-737.

- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., 2006. Technological and Molecular Characterisation of enterococci Isolated from North–West Italian Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16, 867-875.
- Morandi, S., Silveti, T., Miranda Lopez, J.M., Brasca, M., 2015. Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *Journal of Food Safety*, 35, 193-205.
- Murray, B.E., 1990. The Life and Times *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 45-65.
- Murray, B.E., 1998. Diversity Among Multidrug Resistant *Enterococcus*. *Emerging Infectious Diseases*. 4(1), 37-47.
- Niu, H., Yu, H., Hu, T., Tian, G., Zhang, L., Guo, X., Hu, H., Wang, Z., 2016. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 691-696.
- Okazaki, A., Avison, M.B., 2007. Aph(3')-IIc, an Aminoglycoside Resistance Determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 359-360.
- Okcu, G., Güneş Altuntaş, E., Ayhan, K., 2011. Laktik Asit Fermentasyonunda Fenolik Bileşikler ve Önemi. *Ordu Üniversitesi Bilim Ve Teknik Dergisi*, 1(1), 50-63.
- Oravcova, V., Ghosh, A., Zurek, L., Bardon, J., Guenther, S., Cizek, A., Literak, I., 2013. Vancomycin-Resistant Enterococci in Rooks (*Corvus frugilegus*) Wintering Throughout Europe. *Environmental Microbiology*, 15(2), 548-556.
- Oryaşın, E., 2008. Çeşitli Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Enterokokların Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespiti. *Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü*, 89 Sayfa, Aydın.
- Özden Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y., 2013. Occurrence of Enterocin Genes, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance 3 Bacteriocin-Producer *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *Turkish Journal of Biology*, 37, 443-449.
- Pechere, J.C., 2001. Macrolide Resistance Mechanisms in Gram-positive Cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 25-28.
- Perin, L.M., Miranda, R.O., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Nero, L.A., 2014. Virulence, Antibiotic Resistance and Biogenic Amines of Bacteriocinogenic Lactococci and Enterococci Isolated from Goat Milk. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 121-126.

- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 311-314.
- Ramin, B., Asadpour, L., Tehrani, H.F., Amirmozafari, N., 2017. Detection and Distribution of Various HLAR Gene in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by Multiplex-PCR. *Modern Medical Laboratory Journal*, 1(2), 68-76.
- Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13, 151-171.
- Ramon-Garcia, S., Otal, I., Martin, C., Gomez-Lus, R., Ainsa, J.A., 2006. Novel Streptomycin Resistance Gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50(11), 3920-3922.
- Reuland, E.A., Al, N.N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H., Kluytmans, J.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., 2014. Prevalence of ESBL-Producing *Enterobacteriaceae* in Raw Vegetables. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 1843-1846.
- Rice, L.B., Carias, L.L., Rudin, S., Lakticová, V., Wood, A., Hutton-Thomas, R., 2005. *Enterococcus faecium* Low-Affinity Pbp5 is a Transferable Determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 5007-5012.
- Roberts, M.C., Schwarz, S., 2009. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. In Mayers, M.L. (Ed.), *Antimicrobial Drug Resistance*, Humana Press, 183-193.
- Ruoff, K.L., de la Maza, L., Murtagh, M.J., Spaego, J.D., Ferraro, M.J., 1990. Species Identities of Enterococci Isolated from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 435-437.
- Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Teresa, M.C., Arioli, S., Randazzo, C.L., 2018. *Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano Cheese Types: A Snapshot of Their Antibiotic Resistance Distribution. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 277-286.
- Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F., Font De Valdez, G., 2003. Homemade Traditional Cheeses for the Isolation of Probiotic *Enterococcus faecium* Strains. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 241-245.
- Sahoo, T.K., Jena, P.K., Nagar, N., Patel, A.K., Seshadri, S., 2015. *In Vitro* Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from the Gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, 7, 126-136.



- Said, L.B., Klibi, N., Dziri, R., Borgo, F., Boudabous, A., Slama, K.B., Torres, C., 2016. Prevalence, Antimicrobial Resistance and Genetic Lineages of *Enterococcus* spp. from Vegetable Food, Soil and Irrigation Water in Farm Environments in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1627-1633.
- Salminen, S., Wright, A.V., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Matilla-Sandholm, T., 1998. Demonstration of Safety of Probiotics- a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.
- Saran, B., Karahan, C.Z., 2010. Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış. *Türk Üroloji Seminerleri*, 1, 216-220.
- Sayınır, H.S., 2008. Hastanemizde Sürveyansla Saptanan VRE'lerin Dağılımı, Antibiyotik Duyarlılıkları ve Kolonize Hastalarda Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 67 sayfa, İstanbul.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H., 1993. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-modifying Enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138-163.
- Shete, V., Grover, N., Kumar, M., 2017. Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance among Enterococcal Isolates. *Journal of Pathogens*, 2017, 5.
- Spiegel, C.A., 1988. Laboratory Detection of High-Level Aminoglycoside-Aminocyclitol Resistance in *Enterococcus* spp. *Journal Of Clinical Microbiology*, 26(11), 2270-2274.
- Spratt, B.G., 1994. Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations. *Science*, 264, 388-393.
- Şanlıbaba, P., Şentürk, E., 2018. Prevalence, Characterization and Antibiotic Resistance of Enterococci from Traditional Cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1955-1963.
- Şirin, C., 2004. Isparta Bölgesinde Enterokok Türlerinde Glikopeptid ve Yüksek Düzey Aminoglikozid Direncinin Araştırılması ve Antibiyotik. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 75 sayfa, Isparta.
- Temiz, A., Yılmaz, R., 2003. *Streptococcus Salivarius* subsp. *Thermophilus* ve *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*'un Klasik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması ve Karakterizasyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3), 19-42.

- Templer, S.P., 2006. Antibiotic Resistant Enterococci From Food and Clinical Samples: Microbiological Characterization, Molecular Typing and Genetic Relation of Strains. Inauguraldissertation Der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät Der Universität Bern, Master Science Thesis, 74 Sayfa, Zürich.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F., 1999. Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Food. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 76, 115-137.
- Trieu-Cuot, P., de Cespédès, G., Bentorcha, F., Delbos, F., Gaspar, E., Horaud, T., 1993. Study of Heterogeneity of Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Genes in Streptococci and Enterococci by Polymerase Chain Reaction: Characterization of a New CAT Determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 2593-2598.
- Topal, M., Uslu, G., Arslan Topal, E.I., Öbek, E., 2013. Antibiyotiklerin Tespiti ve Artılması. *Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 29(2), 185-199.
- Tuncer, Y., 2009. Some Technological Properties of Phenotypically Identified Enterococci Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8, 7008-7016.
- Tuncer, M., Özden Tuncer, B., Tuncer, Y., 2014. Çiğ Sütten İzole Edilen Enterococcus B Üreticisi *Enterococcus faecalis* MYE58 Suşunun Güvenlik Değerlendirmesi. *GIDA/ The Journal of Food*, 39(5), 275-282.
- Tyson, G.H., Sabo, J.L., Rice-Trujillo, C., Hernandez, J., McDermott, P.F., 2018. Whole-Genome Sequencing Based Characterization of Antimicrobial Resistance in *Enterococcus*. *Pathogens and Disease*, 76(2), 1-5.
- Ulusoy, S., 2010. 1986'dan 2010'a Kinolonlar. *Ankem Dergisi*, 24(2), 96-100.
- Ünal, N., Yıldırım, M., 2010. Türkiye'de Ticari Broyler İşletmelerinden vanA Pozitif *Enterococcus faecium* İzolasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(1), 127-129.
- Vakulenko, S.B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A.M., Zervos, M.J., Lerner, S.A., Chow, J.W., 2003. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1423-1426.
- Vakulenko, S.B., Mobashery, S., 2003. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 430-450.
- Van Bambeke, F., Michot, J.M., Van Eldere, J., Tulkens, P.M., 2005. Quinolones in 2005: an Update. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 256-280.

- Yalanca, İ., 2009. Geleneksel Et Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 61 Sayfa, Adana.
- Yalman, I.Y., 2014. Kilis İli Şehir Şebeke Suları, Kuyu Suları vb. Su Kaynaklarının Mikrobiyal Özelliklerinin Tespit ve Analizleri ile İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliklerinin Saptanması. Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 98 sayfa, Kilis.
- Yamazhan, T., 2007. Sulfonamidler ve Aminoglikozidler. Ankem Dergisi, 21(2), 52-56.
- Yavaş, E.S., 2015. Gıdalardan İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Türlerinin Aminoasit Dekarboksilaz Aktivitesi Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 177 sayfa, Ankara.
- Yazgı, H., Ertek, M., Uslu, H., Kadanalı, A., 2003. Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ile Beta Laktamaz Üretimi İlişkisi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 33, 333-336.
- Yıldırım, M., 2007. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyonlar. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2, 46-52.
- Yıldız, Ö., 2014. Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Suşlarının Virulens Genlerinin İncelenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 78 sayfa, Aydın.
- Yoğurtcu, N., 2011. Tulum Peynirinden Enterokok Suşlarının İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 81 Sayfa, Isparta.
- Yoğurtcu, N., Tuncer, Y., 2013. Antibiotic Susceptibility Patterns of *Enterococcus* Strains Isolated from Turkish Tulum Cheese. International Journal of Dairy Technology, 66(2), 236-242.
- Yüce, A., 2001. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. Klimik Dergisi, 14(2), 41-46.
- Yüceer, Ö., Özden Tuncer, B., 2015. Determination of Antibiotic Resistance and Biogenic Amine Production of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Turkish Sausage (Sucuk). Journal of Food Safety, 35, 276-285.

- Quednau, M., Ahrne, S., Moln, G., 1999. Genomic Relationships Between *Enterococcus faecium* Strains From Different Sources with Different Antibiotic Resistance Profiles Evaluated by Restriction Endonuclease Analysis of Total Chromosomal DNA Using *EcorI* And *PvuII*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1777-1780.
- Watanakunakorn, C., 1989. The Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistance Among Enterococci Isolated from Blood Cultures During 1980-1988. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 24, 63-68.
- Weissman, D., Spargo, J., Wennersten, C., Ferraro, M.J., 1991. Detection of Enterococcal High-Level Aminoglycoside Resistance with MicroScan Freeze-Dried Panels Containing Newly Modified Medium and Vitek Gram-Positive Susceptibility Cards. *Journal Of Clinical Microbiology*, 29(6), 1232-1235.
- Williams, A.M., Rodrigues, U.M., Collins, M.D., 1991. Intrageneric Relationships of Enterococci as Determined by Reverse Transcriptase Sequencing of Small Subunit rRNA. *Research in Microbiology*, 142, 67-74
- Wright, G.D., Thompson, P.R., 1999. Aminoglycoside Phosphotransferases: Proteins, Structure, and Mechanism. *Frontiers in Bioscience*, 4, 9-21.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Rahime ÖZDEMİR

Doğum Yeri ve Yılı: Üsküdar, 1991

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

E-posta: rahimeozdemir07@gmail.com



### **Eğitim Durumu:**

Lise: 75.Yıl Cumhuriyet Lisesi (2005-2009)

Lisans:

SDÜ, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2010-2015)

Lisans Ortalaması: 3.05

SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü / Çift Anadal Programı (2012-2016)

Lisans Ortalaması: 3.37

Anadolu Üniversitesi / İşletme (Açıköğretim) (Devam Ediyor)

### **Yayınları:**

Özdemir, R., Akpınar Kankaya, D., Özden Tuncer, B., Tuncer, Y., 2017. Aminoglycoside Resistance in Enterococci. Poster Sunu. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 15-17 May 2017, Kapadokya, Türkiye, s 1182.

Özdemir, R., Tuncer, Y., 2017. Süt ve Süt Ürünlerinde Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) *Enterococcus* spp. Yaygınlığının Araştırılması. Poster Sunu. ICAE, 16-18 Kasım, Antalya, Türkiye, s 51.

Özdemir, R., Tuncer, Y., 2017. Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) *Enterococcus* spp. İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin ve Aminoglikozid-modifiye Edici Enzim (AME) Genlerinin Belirlenmesi. Poster Sunu. ICAE, 16-18 Kasım, Antalya, Türkiye, s 52.

Özdemir, R., Tuncer, Y., 2018. Süt ve Süt Ürünlerinden İzole Edilen Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) *Enterococcus* spp. İzolatların Gentamisin ve Streptomisin Antibiyotiklerine Karşı MİK Değerlerinin Belirlenmesi. Poster Sunu. IHSLC, 02-05 Mayıs, Burdur, Türkiye, s 150-151.

Özdemir, R., Tuncer, Y., 2018. Çiğ Süt ve Peynirden İzole Edilen Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli (YSAD) Enterokokların Aminoglikozid-modifiye Edici Enzim (AME) Genleri Varlığının Araştırılması. Sözlü Sunu. IHSLC, 02-05 Mayıs, Burdur, Türkiye, s 475.

Özdemir, R., Gülmez, A., Özgen, Z., Ulutürk, Ş., Kök Taş, T., 2018. Diyabetli Bireyler için Farklı Tatlandırıcıların Dondurmada Kullanımı ve Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. Süt Dünyası Dergisi, 13(70), 46-50.