

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENTANSİF BROYLAR İŞLETMELERİ İLE KIRSAL TAVUKÇULUK
İŞLETMELERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOKLARIN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE
ÇALIŞMALAR**

Veteriner Hekim Zahide DİLİK

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU**

2008- KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ENTANSİF BROYLER İŞLETMELERİ İLE KIRSAL TAVUKÇULUK
İŞLETMELERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOKLARIN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE
ÇALIŞMALAR**

Veteriner Hekim Zahide DİLİK

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU**

Bu tez, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (No: K.Ü. BAP 2005/11) tarafından desteklenmiştir.

2008- KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2008

İmza

Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Nejat AYDIN
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İmza

Doç. Dr. Dilek KILIÇ
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Üye

İmza

Doç. Dr. Aylin KASIMOĞLU DOĞRU
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İmza

Doç. Dr. Murat YILDIRIM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	V
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Çizelgeler	VII
Resimler	VIII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ	5
1.1 Genel Bilgiler	7
2.GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1 Örneklerin alınması	29
2.2 İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları	29
2.2.1 Besiyerleri	29
2.2.2 Enterokokların İzolasyon ve İdentifikasyonu	30
2.2.2.1 Katalaz Testi	30
2.2.2.2.Safra Eskülin Testi	30
2.2.2.3. Pironidonil-β- naftilamid (PYR) Testi	31
2.2.2.4. %6.5 luk NaCl de Üreme Testi	31
2.2.2.5. Arjinin Dekarboksilasyon Testi	32
2.2.2.6. Hareket Testi	33
2.2.2.7. Pigmentasyon Testi	33
2.2.2.8. Piruvat Test	33
2.2.2.9. Karbonhidrat Fermentasyon Testi	34
2.3 Antibiyotik Duyarlılık/Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi	35
2.4. Plazmid Profil Analizi	36
2.4.1 Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	36
2.4.2. Plazmid DNA İzolasyonu	36
2.4.3. Plazmid Profil Analizleri	37
3. BULGULAR	38

4.TARTIŞMA VE SONUÇ	44
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65

ÖNSÖZ

Enterokok'lar insan ve hayvanların sindirim sisteminde deri, ağız boşluğu ve safra yollarında normal florada bulunan, yüksek sıklıkla genetik madde değişim kapasiteleri ve yüksek düzeyde antibiyotik dirençlilik özellikleri ile dikkat çeken mikroorganizmalardır. Toplum ve hastane kökenli infeksiyonlarının en sık etkenlerinden olup son yıllarda özellikle hastane infeksiyonlarında önemleri giderek artmıştır. Enterokok infeksiyonlarının ve antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin kontrolü amacıyla direnç saptama ve tarama yöntemlerinin, risk faktörlerinin ve kontrol önlemlerinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Doktora eğitimim süresince destek ve ilgilerini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi deneyimlerinden yararlandığım, ilgi ve hoşgörülerini esirgemeyen, fikirleri ile bize yol gösteren değerli hocam, Danışmanım Sayın Prof. Dr. Ersin İSTANBULLUOĞLU' na sonsuz teşekkür ederim.

Bilgi, deneyim ve sahip olduğu kaynaklardan yararlanma olanağı bulduğum Sayın Doç. Dr. Murat YILDIRIM hocama,

Tezimin projelendirilmesini sağlayan, bilgi, deneyimlerini, her türlü yardım ve yakın ilgilerini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Aylin KASIMOĞLU DOĞRU hocama,

Çalışmalarım sırasında sağladıkları değerli imkanlarla araştırmanın yapılmasına katkıda bulunan Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden Sayın Prof. Dr. Ahmet BAŞUSTAOĞLU hocama ve Dr Kenan ŞENER hocama,

Doktora çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini, yardım ve yakın ilgilerini gördüğüm Fakültemiz Dekanı Sayın Prof. Dr. Ertuğrul ELMA hocama ve Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Dilek KILIÇ hocama,

Laboratuvar çalışmalarında değerli yardımını esirgemeyen, Dr. Araş. Gör. Nilgün Ünal, Araş. Gör. Fatma Sakarya, Araş. Gör Şinasi Aşkar ve Uzm. Bio. Oya Doğu Çınar arkadaşlarıma ve yetişmemde büyük özveri gösteren anneme, babama ve eşime teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute
ESP	Ekstraselüler Yüzey Proteinleri
EBS	Enterokokkal Bağlanma Maddesi
ENR	Enrofloksasin
E	Eritromisin
I	Orta Duyarlı
Kb	Kilobaz
LAP	Lösin-Amino-Peptidaz
MDa	Megadalton
MIC	Minimal İnhibitor Konsantrasyon
MLS_B	Makrolid - Linkozamid- StreprograminB
NaCl-EDTA	Sodyum Klorür- Etilen Diamin Tetra Asetikası
PBP	Penisilin Bağlayan Proteinler
P	Penisilin
PYR	Pirolidonil-β-naftilamid
R	Dirençli
S	Duyarlı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tetrasiklin
TEC	Teikoplanin
Tn	Transpozon
TTC	Trifenil Tetrazolium Klorid
RA	Rifampin
K/D	Kinopristin/Dalfopristin
VA	Vankomisin
VRE	Vankomisin Dirençli Enterokok

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Glikopeptid dirençli enterokoklarda fenotipik ve genotipik özellikler

Çizelge 2.1. Enterokok suşlarının izole edildiği dışkı materyalinin dağılımı ve izolat sayısı

Çizelge 2.2. Enterokok suşlarının orijini, biyotipleri ve dağılım oranları

Çizelge 2.3. Enterokok suşlarının kinopristin/dalfopristin (15µg) dirençlilik/duyarlılık oranları

Çizelge 2.4. Enterokok suşlarının antibiyotik dirençlilik /duyarlılık oranları

Çizelge2.5. Köy tavukları kökenli enterokok suşlarının plazmid ve antibiyotik direnç profilleri

Çizelge 2.6. Broyler kökenli enterokok suşlarının plazmid ve antibiyotik direnç profilleri

RESİMLER

Resim 1.1: Safra- eskülin testi

Resim 1.2: Pirolidonil- β - naftilamid (PYR) testi

Resim 1.3: %6,5 luk NaCl de üreme testi

Resim 1.4: Arjinin dekarboksilasyon testi

Resim 1.5: Hareket testi

Resim 1.6: Piruvat test

Resim 1.7: Karbonhidrat fermentasyon testi

Resim 1.8: Antibiyogram

Resim 2.1: Enterokok suşlarının agar jel elektroforezde plazmid profilleri

ÖZET

Entansif Broyler İşletmeleri ile Kırsal Tavukçuluk İşletmelerindeki Hayvanlardan İzole Edilen Enterokokların Fenotipik ve Genotipik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar

Bu çalışmada, entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerindeki hayvanların bağırsak florasındaki *Enterococcus* türlerinin varlığı, yaygınlığı, biotipleri ve izole edilen suşların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik özellikleri ile plazmid profillerinin araştırılması amaçlandı.

Ticari broyler işletmelerinden 400 adet, kırsal tavukçuluk işletmelerinden 304 adet kloakal svap örnekleri toplandı. İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucuna göre enterokok suşlarının %54.3' ünün (202 adet) *E.faecium*, %22.3' ünün (83 adet) *E.gallinarum*, %14.7'sinin (55 adet) *E.faecalis*, %4.3' ünün (16 adet) *E.mundti*, %1.6'sının (6 adet) *E.casseliflavus*, %1'inin (4 adet) *E.raffinusus*, %1'inin (4 adet) *E.durans*, %0.2'sinin (1 adet) *E.solitarius* ve %0.2'sinin (1 adet) *E.hirae* türlerine ait olduğu belirlendi.

Broyler işletmelerinden izole edilen enterokok suşlarının penisiline %5.6, tetrasikline %72, eritromisine %59.3, enrofloksasine %8.7, kinopristin/dalfopristine %33.6, rifampine %10.9, vankomisine %0.4, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine %6.5 ve %23.1 oranında dirençli oldukları saptandı. Suşların %100'ünün ise linezolid ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu bulundu.

Kırsal tavukçuluk aile işletmelerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasiklin, eritromisin enrofloksasin ve kinopristin/dalfopristin direnci sırasıyla %2, %2, %1.3 ve %4.8 oranında olduğu saptandı. Tüm suşların linezolid, gentamisin, streptomisin, penisilin, vankomisin, teikoplanin ve rifampin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlendi.

Antibiyotik dirençli 50 adet enterokok suşunun plazmid profili belirlendi. Plazmid varlığı saptanan 22 (%44) enterokok izolatının 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb büyüklüğündeki sekiz farklı plazmidin oluşturduğu ve bunların dokuz plazmid paternine ayrıldıkları belirlendi. Elli enterokok izolatının 28 tanesinde (%56) plazmid saptanamadı.

Anahtar Sözcük: Antibiyotik direnci, *Enterococcus*, Fenotipik özellik, Tavuk, Plazmid profili,

SUMMARY

Studies on Phenotyping and Genotyping Characterization of *Enterococcus spp.* Isolated from Extensive Broiler Farm and Rural Poultry Establishment

In this study, we aimed to investigate the prevalence, phenotyping and genotyping characteristics, susceptibility/resistance patterns to several antibiotics and plasmid profiles of *Enterococcus spp.* isolated from extensive broiler farms and rural poultry establishment.

Local swabs were collected from 400 extensive broiler farms and 304 rural poultry establishment. According to isolation and identification results, enterococcus isolates consisted of 54.3% (202 isolates) *E.faecium*, 22.3% (83 isolates) *E.gallinarum*, 14.7% (55 isolates) *E.faecalis*, 4.3% (16 isolates) *E.mundtii*, 1.6% (6 isolates) *E.casseliflavus*, 1% (4 isolates) *E.raffinosis*, 1% (4 isolates) *E.durans*, 0.2% (1 isolates) *E.solitarius* and 0.2% (1 isolates) *E.hirae*.

5.6% of broiler enterococci strains were found to be resistant to penicillin, 72% were resistant to tetracycline, 59.3% were resistant to erythromycin, 8.7% were resistant to enrofloxacin, 33.6% were resistant to quinupristin/dalfopristin, 10.9% were resistant to rifampin, 0.4% were resistant to vancomycin, 6.5% and 23.1% were resistant to high level streptomycin and gentamicin. Teicoplanin and linezolid susceptibility of enterococcus isolates was found in 100%.

2%, 2%, 1.3% and 4.8% of rural enterococci strains were resistant to tetracycline, erythromycin, enrofloxacin and quinupristin/dalfopristin respectively. All of *Enterococcus spp.* were found to be sensitive against linezolid, gentamicin, streptomycin, penicillin, vancomycin, teicoplanin and rifampin of antibiotics.

Plasmid profiling of 50 antibiotic resistant enterococcus isolates was determined. 22 (44%) *Enterococcus* isolates possessed nine different plasmid patterns

having 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb respectively. 28 isolated (56%) enterococcus did not have any plasmid.

Key Words: Antibiotic resistance, *Enterococcus*, Fenotyping features, Plasmid profiling, Chicken.

1.GİRİŞ

Enterokok'lar, Gram pozitif katalaz negatif koklar olup, ekosistem içinde toprakta, suda, bitkilerde, gıdalarda, hayvanların ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında bulunurlar. Enterokok'lar fırsatçı patojenler olup beslenme ve bakım şartlarının uygun olmadığı hayvanlarda septisemi, üriner sistem infeksiyonuna, endokarditlere, ishale ve otitis eksternaya neden olmaktadır. Enterokok'lar insanlarda ve bilhassa stres altındaki; immun sistemi zayıf olan bireylerde üriner sistem infeksiyonlarına, endokarditlere, menenjitlere, bakteriyemiye, cerrahi yara infeksiyonlarına sebep olurlar (Facklam ve ark. 1999, Quinn ve ark. 2000, Koch ve ark. 2004, Hirsh ve ark. 2004).

Enterokok'lar gerek, klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, düşük düzey penisilin ve düşük düzey aminoglikozide gösterdiği intrinsik direnç özellikleri ile gerekse, mutasyon ve genetik madde aktarımı sonucu kazandıkları eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, rifampin, nitrofurantoin, fusidik asit, florokinolon, vankomisin, yüksek düzey aminoglikozid, yüksek düzey penisilin direnç özellikleri ve beta-laktamaz aktiviteleri ile her türlü ortamda canlılıklarını sürdürebilme yeteneklerinden dolayı bu kommensal bakteriler nozokomiyal patojenler arasında hızla yerini almıştır. İlk tanımlandıkları yıllarda sadece endokardit olgu örneklerinde etken olarak tanımlanan enterokoklar, günümüzde hastane infeksiyonlarında giderek artan izolasyon oranları ve çoklu antibiyotik direnç özellikleri nedeni ile önemli ve sorunlu Gram pozitif bakteriler arasında sayılmaya başlanmıştır (Berzeg 2005).

Broyle rasyonlarına gerek büyütme, gerekse tedavi ve koruyucu amaçlı olarak katılan antibiyotikler, antimikrobiyal dirençli *Enterococcus spp.*'nin selektif seçilmesine neden olmaktadır. Enterokok'lar, sahip oldukları antimikrobiyal dirençli genlerini, plazmid ve transpozonlar aracılığı ile ekosistem içerisinde, insanlar için patojen olan *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.* ve *Streptococcus spp.* gibi Gram pozitif bakterilere transfer edebildikleri ortaya

konulmuştur (Leclerg ve Courvalin 1996, Bager ve ark. 1997, Rodrigues ve ark. 2002).

Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda, tavukların, insanlarda hastane infeksiyonlarına sebep olan antibiyotik dirençli enterokoklar için potansiyel rezervuar olduğu ortaya konulmuştur. Avrupa'da, pek çok hayvanda bulunan vankomisin dirençli enterokokların halk sağlığı sorunlarına yol açtığı rapor edilmiştir. Türkiye'de ilk VRE 1998 yılında ortaya çıkmıştır. Türkiye'de Tıp fakültesi hastanelerinde yapılan çalışmalarda, dirençli enterokokların varlığı tespit edilmiştir. Ankara'da yapılan çalışmada tavuk ve köpeklerden izole edilen enterokok suşlarının % 13-14'ünde vankomisin direnci saptanmıştır (Hoşgör ve ark. 1997, Çınar ve ark. 1999, Çelik 2001, Ersoy ve ark. 2001, Harwood ve ark. 2001).

1.1 Genel Bilgiler

Enterokok'lar ışık mikroskobunda tek tek veya çift olarak kısa zincirler halinde görülen Gram pozitif koklardır. Enterokok'lar, zaman zaman taze kanlı agar kültürlerinden yapılan Gram boyamada koko-basil tarzında, thioglikolatlı buyyondan yapılan boyamalarda ise daha oval zincir halinde görülmektedir. Enterokok'lar fakültatif anaerob bakteriler olup optimum üreme koşulları 35°C ve pH 7.0 dır. Enterokok suşlarının çoğu 10- 45°C arasında ve pH 4.2- 9.6' da üreme göstermektedirler. Ayrıca enterokoklar %6.5 NaCl içeren sıvı besi yerlerinde ürer, %40 oranında safra tuzu varlığında eskülini hidrolize eder ve glikoz fermentasyonu sonucu laktik asit oluştururlar. Fakat gaz oluşturmazlar. Enterokok'ların çoğu 60 °C de 30 dk. ısıtmaya dayanırlar. Enterokok'ların bazı türleri hareketlidir. *E.cecorum*, *E.colombae* ve *E.saccharolyticus* türleri hariç diğer enterokok türleri pirolidonil-β-naftilamid'i (PYR) ve tüm türler lösin-amino-peptidi (LAP) hidrolize ederler (Facklam ve ark. 1999).

Enterokok'lar katalaz negatiftirler. Ancak *E.faecalis*'in kanlı besi yerlerindeki üremelerinde, bazen katalaz testinde yanlış pozitif varlığı söz konusu olduğunda zayıf bir köpürme görülmektedir. Enterokok'lar kanlı agarda alfa, beta ve nonhemolitik özellik göstermektedir. Bununla birlikte at, tavşan ve insan kanlı agarda beta hemoliz oluştururlar. Enterokok' lar protein ve polisakkaridlerden oluşan bir hücre duvarına sahiptir. Enterokok'ların çoğu Lancefield'in Grup D karbonhidratlarına sahiptir. Lancefield'in Grup D antijeni, hücre duvarı ile bağlantılı bir gliserol olan teikoik asitten oluşur (Facklam ve ark. 1999).

Enterokok adı, ilk kez 1899 yılında Fransa'da Tiercelin M.E. tarafından yeni bir Gram pozitif diplokokun bağırsak kökenli olduğunu belirtmek amacıyla kullanıldı. Aynı yıllarda Mc Callum ve Hastings, endokardit olgusundan izole ettikleri bakteriye *Micrococcus zymogenes* adını verdiler. Aynı araştırmacılar daha sonraki yıllarda yaptıkları çalışmalarda bu bakterinin hemolitik bir *Enterococcus* suşu olduğunu açıkladılar. Andrewes ve Horder 1906 yılında endokarditli bir hastanın dışkılarından *Streptococcus faecalis*'i izole ettiler. 1919 yılında Orla - Jensen

tarafından *Streptococcus glycerinaceus* ve *Streptococcus faecium* tanımlandı. 1933 yılında Lancefield enterokokları D grubu antijen üreten streptokok olarak adlandırdı. Sherman 1937 yılında Streptokokları; enterokoklar, laktik asit streptokoklar, viridans ve piyojen streptokoklar olarak dört gruba ayırdı. Kalina 1970 yılında *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium*' un *Streptococcus* cinsinden farklı bir genetik yapıya sahip olmalarından dolayı farklı bir soya alınmalarını önerdi. Shleifer ve Klipper- Balz, 1984 yılında enterokok genusunun tanımlamasını yaparak *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium*' un streptokoklardan farklı genetik yapıya sahip olmalarından dolayı bu türleri enterokok genusuna transfer ettiler (Murray 1990, Facklam ve ark. 1999, Klein 2003).

Son yıllarda moleküler teşhis ve tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler sonucunda *Enterococcus* cinsi içinde 26 türün varlığı çeşitli çalışmalarla ortaya kondu. 16S rRNA sekans analiz sonuçlarına göre enterokok türleri 7 farklı grup altında sınıflandırılmaktadır (Klein 2003).

Bunlar:

***E.faecalis* grubu:** *E.faecalis*, *E. haemoperoxidus* ve *E moraviensis*

***E.faecium* grubu:** *E.faecium*, *E.durans*, *E.hirae*, *E.mundtii*, *E.porcinus*,
E.villorum

***E. avium* grubu:** *E.avium*, *E.pseudoavium*, *E.malodoratus*, *E.raffinosis*,

***E.casseliflavus* grubu:** *E.casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E.flavescens*

***E.cecorum* grubu:** *E.cecorum*, *E.columbae*,

***E.dispar* grubu:** *E.dispar*, *E.asini*,

***E. saccharolyticus* grubu:** *E.saccharolyticus*, *E.sulfureus*

Tavuk, inek ve domuzların gastrointestinal florasında *E.faecium*, *E.faecalis* ve *E.cecorum* türleri yüksek oranlarda, *E.gallinarum*, *E.hirae* ve *E.durans* türleri ise az oranlarda bulunmaktadır (Klein 2003).

Enterokok'lar diğer patojen bakterilerde bulunan toksin gibi virülens faktörlerine sahip olmadıkları için düşük virülensli kommensal bakteriler olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte enterokoklar predispoze edici faktörlerin etkisi

altında meydana gelen sporadik infeksiyonlarda ağır klinik belirtilerin oluşmasına ve yüksek ölüm oranlarına neden olmaktadır. Enterokok'lar patolojik değişikliklere yol açabilen birçok virülens faktörü üretir (Çelik 2001).

Agregasyon (kümelenme) maddesi, enterokokların yüzeylerinde bulunan bir protein olup plazmid transferi sırasında verici ve alıcı enterokokların birbirlerine temas etmesini ve konjugasyon sırasında kümelenmesini sağlar. Agregasyon maddesi, bağırsak ve böbrek epitelyum hücreleri dahil invitro ökaryotik hücrelere *E.faecalis*'in yapışmasını sağlar (Olmsted ve ark. 1994, Dunny ve ark. 1995).

Sitolizin, protein yapısında hemolitik özelliğe sahip bir toksindir. Sitolizinin hedef hücreleri arasında eritrositler, lökositler, makrofajlar ve Gram pozitif bakteriler bulunmaktadır (Ike ve Clewell 1992, Miyazaki ve ark. 1993).

Enterokok'ların hücre membranında bulunan lipoteikoik asit poligliserolfosfat yapısına sahiptir. Lipoteikoik asit, insan monositlerinde sitokin üretimini stimüle eder. Lipoteikoik asit, verici hücre agregasyon maddesinin alıcı hücreye bağlanmasını sağlar ve enterokokkal bağlanma maddesi (EBS) olarak görev yapmaktadır (Ehrenfeld ve ark. 1986, Bhakdi ve ark. 1991).

Jelatinaz, kollajen, jelatin ve küçük peptitleri hidrolize ederek dokularda bakteriyel yayılımı artırmaktadır (Dupont ve ark. 1998). Coque ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmada endokarditli hastalardan %54, kan kültüründen %68 ve dışkıdan %27 oranında jelatinaz üreticisi *E. faecalis* izole edilmiştir. *E. faecium*' da jelatinaz üretimine rastlanmamıştır.

Enterokok'lardan salgılanan hyaluronidaz enzimi, fagositozdan korunmanın yanı sıra yumuşak doku infeksiyonlarına ve insanlarda invazif hastalıklara neden olan bir virülens faktörüdür. Hyaluronidaz bağ dokusunu parçalayarak infeksiyonun dokulara yayılmasına sebep olur (Jett ve ark. 1994).

AS-48, *E. faecalis* tarafından üretilen, 7,4 kDA ağırlığında bir peptittir. AS-48, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin çoğuna karşı litik aktivite göstermektedir. Bununla birlikte otolizin aktivitesi ile enterokokların da lize olmasına yol açmaktadır (Gimenez-Gallego ve ark. 1989, Galvez ve ark. 1989).

Enterokok'larda virülensi sağlayan ekstraselüler yüzey proteinleri (ESP) bulunmaktadır. Bunlar genellikle VanB içeren *E. faecalis*'in klinik izolatlarında tespit edilmiştir. Enterokokkal *esp* genleri virulens özelliğe sahip bakteriyel yüzey proteinini kodlar. *Esp* gen proteinleri bakterinin immun yanıtta kurtulmasını sağlamaktadır (Sahm ve ark. 1989, Shankar ve ark. 1999).

Enterokok'lar, hayvanlarda değişik klinik bulgulara neden olmaktadır. *Enterococcus faecalis* tavuklarda, pulmoner hipertansiyon sendromuna ve amiloid artropadiye neden olmaktadır. *E. durans* ve *E. hirae* ise tavuklarda bakteriyemiye, ensafalomalaziye, nörolojik bozukluklara, endokarditlere, büyüme geriliğine ve beyinde fokal nekrozlara yol açmaktadırlar. Ayrıca enterokoklar broylerde kemik lezyonlarına ve topallıklara sebep olurlar. Devriese ve ark. (1990) tarafından *E. faecalis*'in kanaryalarda tracheitise ve yavru ördeklerde sistemik infeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (Thankson ve ark. 2002, Jackson ve ark. 2004).

Enterokok'lar kedi ve köpeklerde otitis eksternaya ve nadiren de üriner yolu infeksiyonlarına neden olmaktadır. *E. durans*, *E. hirae* ve *E. villorum* türleri köpek, kedi, tay ve buzağılarda ishale yol açmaktadır. Lapointe ve ark. (2000) tarafından *E. hirae*'nin bir kedide enteropatiye, karaciğer safra kanalı ve pankreatik kanalında supuratif yangıya neden olduğu rapor edildi (Elsinghorst 2003, Hirsh ve ark. 2004).

Enterokok'lar, son yıllarda hastane infeksiyonlarının etiyolojisinde *Staphylococcus spp.* ve *Escherichia spp.* ile birlikte önem kazanan mikroorganizmalar konumundadır. Amerika'da enterokoklar nozokomiyal infeksiyonların yaklaşık %12'sinden sorumlu oldukları ileri sürülmektedir. Kan kültürlerinden izole edilen enterokokların %69' u gerçek bakteriyemi etkeni, bunların da %79.9' u nozokomiyaldir. Bakteriyemi kaynağı genellikle ürogenital

sisteme kontamine kateter veya intravenöz gereçlerden kaynaklanmaktadır. Enterokok'lar Amerika' da hastane kaynaklı bakteriyemi etkenleri arasında üçüncü ülkemizde de beşinci sırada yer almaktadır. Enterokok infeksiyonlarında mortalite oranı %13.1 dir. Türler arasında nosokomiyal infeksiyondan *E.faecalis* %85-89, *E.faecium* %10-15, *E.durans*, *E.gallinarum* ve *E.casseliflavus* türleri %5' ten az oranda sorumludur (Koneman ve ark. 1997, Delisle ve Perl 2003, Sümerkan 2004, Ustaoglu ve ark. 2006).

Enterokok'lar çok virulan bir bakteri olmamasına rağmen, özellikle, hastaneye yatırılan yaşlı, immunsuprese ve ciddi hastalığı olanlarda infeksiyon oluşturmaktadır. Enterokok türleri, üriner sistem ve yara infeksiyonlarının yanı sıra bakteriyemi, endokardit, salpinjit, endometrit, peritonit, safra yolu infeksiyonları, karıniçi abseleri bazen menenjit gibi ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca enterokoklar sistitis, pyelonefritis, prostatitis, perinefrik apselere, solunum yolu infeksiyonları ve neonatal sepsise yol açmaktadır (Dargere ve ark. 2002).

Enterokok'larda iki tip antimikrobiyal direnç vardır. İntrinsik tip ve kazanılmış tip olarak tanımlanır. İntrinsik direnç, enterokokların karakteristik özelliklerinden biri olup kromozomal kaynaklıdır. Kazanılmış direnç enterokokların DNA'sında oluşan mutasyonlar sonucu veya plazmid DNA aktarımı ve transpozonlar aracılığı ile olmaktadır. Enterokok'lar penisilinlere, sefalosporinlere, trimetoprim/sulfametoksazole, nalidiksik asite, linkozamidlere, düşük seviye aminoglikozid ve klindamisinlere karşı intrinsik direnç gösterir. Enterokok'lar vankomisine, kloramfenikole, eritromisine, tetrasikline, florokinolona, beta laktamaz üreten penisilinlere, yüksek seviye aminoglikozidlere ve klindamisinlere karşı ise sonradan direnç göstermektedirler (Murray 1990).

Enterokok'ların beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç göstermeleri karakteristik özelliklerinden biridir. Bu tip direnç, enterokokların hücre duvarından salınan PBP' lerin (penisilin bağlayan proteinler) betalaktamlara karşı kalıtsal olarak düşük affiniteye sahip olmalarından meydana gelmektedir. *E.faecalis* izolatları penisiline streptokoklardan 100 kat daha az duyarlı iken *E. faecium* izolatları

E.faecalis'ten 16 kez daha az duyarlıdır. *E.faecalis* izolatlarının çoğu plazma MIC değeri 1-8 µgm/ml olan penisilin konsantrasyonlarını inhibe edebilmesine karşın *E.faecium* izolatları plazma MIC değeri 16-64 µgm/ml olan penisilin konsantrasyonlarını inhibe edebilmektedirler (Murray 1990, Murray 1997). Rice ve ark. (2005) *E.faecium* izolatlarındaki yüksek düzey penisilin direncini sağlayan PBP-5'in, verici *E.faecium* suşundan alıcı *E. faecium* suşuna transfer olabildiğini rapor etmişlerdir.

Enterokok'ların aynı zamanda beta laktamlara karşı toleransı (MIC>32 µgm/ml) yüksektir. Enterokok'ların bu özelliği sonradan kazanılan bir yapıdır. Beş doz veya daha yukarı penisilin kullanımından sonra enterokoklarda tolerans gelişmektedir. Bu yüzden enterokok infeksiyonlarında (endokarditis, meningitis bakteriyemi) bu antibiyotikler yalnız kullanıldığında etki etmezler. Beta laktamaz üretimi, enterokoklarda sık görülmeyen bir özellik olup en çok *E. faecalis* suşlarında görülmektedir. Enterokok'larda beta laktamaz enzimini kodlayan gen, transfer edilebilen bir plazmid üzerinde bulunmaktadır. Bazı *E. faecalis* suşlarında, bu genin kromozomlarda yerleştiği gösterilmiştir (Moellering 1998, Patterson ve ark. 1998).

Enterokok'lar intrinsik olarak düşük düzeyde aminoglikozidlere (MIC 8- 256 µgm/ml) direnç gösterirler. Bu direnç aminoglikozidlerin hücre duvarından geçebilme yeteneğindeki azlıkla ilişkilidir. Bununla birlikte aminoglikozidler penisilin gibi hücre duvarına etkili ajanlarla birlikte verildiğinde direnç yenilmektedir (Murray 1990).

Enterokok'lar aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde direnç kazanabilmektedir. Yüksek düzey aminoglikozid direncinin, organizmayı inhibe etmek için gerekli olan ilaç konsantrasyonu MIC, $\geq 2000\mu\text{g/ml}$ düzeye geldiğinde meydana geldiği ortaya konulmuştur. Yüksek düzey aminoglikozid direncini, plazmid ve transpozonlar tarafından kodlanan modifiye aminoglikozid enzimleri oluşturmaktadır. Bunlar sıklıkla ;

- İki fonksiyonlu 2' fosfotransferaz ve 6' asetil transferaz enzimleri bütün aminoglikozidlere karşı (streptomisin hariç kanamisin, gentamisin, amikasin, netilmisin ve tobramisin) yüksek düzey direnç,

- 3' fosfotransferaz enzimi, penisilin- amikasin kombinasyonu ve kanamisine karşı yüksek düzey direnç,

- 6' adenil transferaz enzimi, streptomisine karşı yüksek düzey direnç sağlar.

Yüksek düzey aminoglikozid direnci ribozomlarda aminoglikozidlerin bağlanma yerinin değişmesiyle de oluşmaktadır. Bu ribozomal direnç yalnızca streptomisinlere karşı oluşan, transfer edilmeyen ve nadir görülen bir direnç tipidir (Murray 1990).

Enterokok'ların, peptidoglikan sentezinde 2 D - alanin molekülünün bir ligaz enzimi tarafından birbirine bağlanması, oluşan D-ala-D-ala' nın UDP-N-asetil muramil-tripeptide eklenerek UDP N-Asetil muramil-pentapeptidin oluşması ve bunu da transglikozilasyon yoluyla mevcut peptidoglikanın eklenmesi gerekmektedir. Vankomisin ve teikoplanin, bu pentapeptidin D-ala-D-ala terminaline yüksek bir afiniteyle bağlanarak peptidoglikan sentezinin transglikozilasyon aşamasını inhibe eder. Glikopeptidler D-alanin-D alanin dipeptid yapısına bağlanmasını takiben bu prekürsörler hücre duvarı sentezinde kullanılamaz. Enterokok'larda glikopeptid direncinin temeli, D-ala-D-ala yerine D-ala-D-lac (VanA ve VanB) veya D-ala-D-ser (VanC) ile biten peptidoglikan prekürsörlerinin sentezlenmesine dayanmaktadır. Vankomisin ve teikoplanin bu yeni terminale yüksek afiniteyle bağlanamaz ve duvar sentezini inhibe edemez (Çetinkaya ve ark. 2000).

Enterokok'larda bugüne kadar glikopeptidlere karşı tanımlanmış altı direnç fenotipi mevcuttur (Çizelge1.1).

Çizelge1.1: Glikopeptid dirençli enterokoklarda genotipik ve fenotipik özellikler (Arthur ve Courvalin 1993, Çetinkaya ve ark. 2000).

Direnç Fenotipi	Predominant Fenotip	Ekspresyon Şekli	Predominat Lokasyon	Transferabl Elemanlar	Alternatif Prekursör	Bulunduğu Türler
VanA	Van \geq 256 Tec \geq 32	İndüklenebilir	Plazmid (kromozom)	Tn1546	D-Ala-D-Lac	E.faecium, E.faecalis E.hirae, E.avium, E.durans, e.mundtii
VanB	Van 4-1.000 Tec \leq 1	İndüklenebilir	Kromozom (plazmid)	Tn1547 Tn5382	D-Ala-D-Lac	E.faecium, E.faecalis
VanC ₁ VanC ₂ VanC ₃	Van 2-32 Tec \leq 1	Yapısal veya İndüklenebilir	Kromozom	?	D-Ala-D-Ser	E.gallinarum(vanC ₁) E.casseliflavus(vanC ₂) E.flavescens(vanC ₃)
VanD	Van 64-256 Tec 4-32	Yapısal veya İndüklenebilir	Kromozom	?	D-Ala-D-Lac	E.faecium, E.faecalis
VanE	Van=16 Tec=0.5	?	Kromozom	?	D-Ala-D-Ser	E.faecium, E.faecalis
VanG	Van=16 Tec=0.5	?	Kromozom	?	?	E.faecalis

VanA fenotipi, vankomisin (MIC \geq 64 μ g/ml) ve teikoplanine (MIC \geq 16 μ g/ml) yüksek düzeyde dirençlidir. Bu dirençte vankomisin direncinin regülasyonu ve oluşumunda rol alan VanA geni ve diğer genler (VanR, VanS, VanH, VanX, VanY, VanZ) Tn 1546 transpozonu üzerinde yer almaktadır. Bu VanA gen kümesi transfer edilen ve edilemeyen plazmidler ve kromozomlar üzerinde bulunabilmektedir. *E. faecium*'da ise bu gen plazmid üzerindedir. Ligaz özelliğinde olan VanA protein peptidoglikan prekürsörüne D-Ala-D-Lactat'ın bağlanmasını sağlamaktadır. D hidroksi asit dehidrogenaz olan VanH protein, D-Lactat'ın oluşumunu sağlamaktadır. VanX protein D-Ala-D-Ala'nın sentezini engellemektedir. Böylece normal pentapeptid oluşumunu engeller. VanR ve VanS proteinleri, VanHAX gen yığınlarının transkripsiyonunu düzenleyen iki regülatör sistemdir. VanS protein, vankomisin varlığını tespit eden bir sensor olarak görev yapar. VanS daha sonra VanR genini uyararak ve direnç için diğer VanH, VanA, VanX proteinlerinin sentezini başlatır. VanA fenotipleri hem vankomisin hem de teikoplaninin transkripsiyonunu indükler ve VanY ve VanZ genleri bunun devamlılığını sağlamaktadır. VanZ protein teikoplaninin MIC değerinin artmasını sağlarken vankomisinin MIC değerini artıramaz. VanA geni ilk olarak *E. faecium*'da bulunmuştur. Ancak daha sonraki yıllarda bu genin *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde de var olduğu tespit edilmiştir (Clewel 1990, Bugg ve ark. 1991, Arthur

ve ark. 1993, Arthur ve Courvalin 1993, Reynolds ve ark. 1994, Mendez-Alvarez ve ark. 2000).

VanB fenotipi vankomisine (MIC 8-64 µg/ml) dirençli iken teikoplanine (MIC ≤1 µg/ml) duyarlı bir özellik taşır. VanB izolatlarında teikoplanine duyarlılık değişmezken vankomisin MIC düzeyi 8-1024 µg/ml oranları arasında değişebilmektedir. Enterokok'larda VanB glikopeptid direncini, VanB ligaz enzimi sağlamaktadır. VanB protein aynı zamanda peptidoglikan prekürsörüne D-Ala-D-Lactat'ın bağlanmasını sağlamaktadır. VanA direnç genlerine benzer şekilde VanB genleri VanH_B, X_B, Y_B, R_B, S_B olarak adlandırılmıştır. VanZ geni VanB fenotipinde bulunmadığı için teikoplanine direnç göstermez ve B sınıfındaki regülatör sistem teikoplanin varlığına duyarsızdır. Teikoplanin VanA ile bağlantılı proteinlerin sentezini meydana getirirken VanB ile bağlı proteinlerin sentezini indüklemeyiz. Yapılan son çalışmalarda VanB ligaz geni VanB₁, VanB₂, VanB₃ olmak üzere üç alt tipe ayrılmıştır. Vankomisin her iki sistemde dirençli proteinlerin sentezini indüklemektedir. VanB genleri çoğunlukla *E.faecium* ve *E.faecalis* türlerinde bulunmaktadır. Ayrıca *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* türlerinin de VanB gen kümesi taşıdığı bildirilmiştir. VanB direncini sağlayan mobil genetik elementler (Tn5382-Tn1549) bir enterokok türünden diğer enterokok türlerine transfer olabilmektedirler (Arthur ve ark. 1995, Baptista ve ark.1996, Dahl ve ark. 1999 Çetinkaya ve ark. 2000).

VanC fenotipi intrinsik direnç göstermekte olup, vankomisine (MIC ≥8 µg/ml ve ≤32 µg/ml) düşük düzey direnç ve teikoplanine (MIC ≤1 µg/ml) duyarlı bir özellik taşımaktadır. Van C fenotipi *E.gallinarium* ve *E.casseliflavus* ve *E.flavescens* türlerinde görülmektedir. VanC₁ geni *E.casseliflavus*, VanC₂ geni *E.flavescens* ve VanC₃ geni *E.gallinarium'* da görülmektedir. VanC gen kümesi D-ala-D-ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezinden sorumludur. VanC fenotipini taşıyan vankomisin dirençli enterokok izolatları arasında vankomisin direnç düzeyinin VanC ligazının ürettiği miktara bağlı olduğu tespit edilmiştir (Clark ve ark. 1998, Çetinkaya ve ark. 2000).

VanD fenotipi, vankomisine (MIC 16-64 µg/ml) ve teikoplanine (MIC 4µg/ml) düşük düzey direnç özelliği taşımaktadır. VanD genleri VanA ve Van B'ye %67 oranında benzerlik göstermektedir. VanD genleri kromozomlar üzerinde lokalize olduğu için diğer enterokok türlerine transfer olamamaktadır (Perichon ve ark. 1997, Casadewall ve Courvalin 1999).

VanE fenotipi, vankomisine düşük düzey direnç (MIC 16 µg/ml), teikoplanine (MIC 0,5 µg/ml) duyarlı bir özellik taşımaktadır. VanE direnç geni *E.faecalis* BM4405 suşunda görülmüştür. VanE direnç fenotipi, intrinsik VanC tip dirence benzer şekilde peptidoglikan prokursürüne D-Ala-D-Ala'nın yerine D-ala-D-ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezinden sorumludur. Ortaya çıkarılan aminoasit dizileri VanC'ye %55, VanA'ya %45 ve VanB'ye %43 oranında yapısal benzerdir (Fines ve ark. 1999).

VanG tipi direnç ilk olarak *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Tipik olarak vankomisine düşük düzey (MIC=16 µg/ml) direnç, teikoplanine duyarlı (MIC=0,5 µg/ml) bir özellik taşır. Nadir görülen bir direnç tipi olup intrinsik özelliğe sahiptir (Depardieu ve ark. 2003).

İnsan orjinli enterokoklarda, ilk glikopeptid direnci, 1986 yılında İngiltere ve Fransa'da, 1987 yılında ABD' de rapor edildi. ABD'de Ulusal Nosokomial Enfeksiyon Sörveyans Sistemi (National Nosocomial Infections Surveillance System) verilerine göre vankomisin direnci 1989 yılında % 0.3 iken 1993'te %7.9'a yükselmiştir. Amerika'da yoğun bakım ünitelerinde ise vankomisin direnci %0.4'ten 34 kat artarak %13.6'ya ulaşmıştır. 1995- 1999 yılları arasında yoğun bakım ünitelerinde vankomisin direncinin %31 oranlarında olduğu belirlendi (Chavers ve ark. 2002).

Türkiye' de vankomisin dirençli ilk *E. faecium* suşu 1998'de Vural ve arkadaşları tarafından bildirildi. Bu suş, bronkopulmoner enfeksiyonu olan bir çocuktan, 15 gün arayla alınmış iki ayrı plevra sıvısından izole edildi. Bunu takiben 1999 yılında Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde laboratuvara gelen kan

kültürlerinden vankomisin dirençli *E. faecium* suşları tespit edildi. 2003 yılı itibariyle VRE (Vankomisin dirençli enterokok) sorunu ile karşılaşan merkez sayısı onu aşmıştır (Vural ve ark. 1999, Başustaoğlu ve ark. 2000, Yetkin ve ark. 2004).

Çiftlik hayvanlarında avoparsinin büyüme faktörü olarak kullanımı sonucu hayvanların gastrointestinal florasında bulunan enterokoklarda vankomisin direnci oluşmuştur. Avoparsin kullanılan hayvanlarda bulunan vankomisin dirençli genlerin insanlara direk temas veya gıdalar yolu ile transfer olabildiği ortaya konulmuştur. Hollanda'da yapılan bir çalışmada *vanA* VRE (vankomisin dirençli enterokok) taşıyıcılığı avoparsinle beslenmeyen hindilerden çok avoparsinle beslenen hindilerde bulunduğu ortaya konuldu. Bu araştırmada avoparsinle beslenen hindilerin dışkılarından %50, hindi çiftliğinde çalışan bakıcıların dışkısından %39, hindi kesimhanesinde çalışanların dışkılarından %20 ve o bölgede oturan insanlardan %14 oranında vankomisin dirençli enterokoklar tespit edildi. Danimarka'da yapılan bir çalışmada VanA taşıyıcılığı, avoparsinle beslenen hayvanların bakıcılarında yüksek oranda bulunmuştur. Hayvan bakıcıları ve hayvanlardan izole edilen *vanA* VRE suşlarının homolog olduğu tespit edildi (Van Den Bogaard ve ark. 1997, Shuford ve Patel 2005).

Glikopeptid antibiyotik grubunda olan avoparsin, 1974 yılında Avrupa'da büyüme faktörü olarak kullanılmaya başlandı. Avrupa'da avoparsin domuz ve tavuklarda farklı yaş gruplarına göre 20mg/kg ve 40mg/kg olarak subterapotik dozlarda kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar, hayvan bağırsak florasındaki duyarlı bakterileri inhibe etmek için uygundu ve belirgin bir şekilde bakteriyel bağırsak florasının düzenini etkilemiştir. Danimarka'da ve diğer ülkelerde insanlarda vankomisin ve teikoplanin tedavi amaçlı kullanılmasına karşın hayvanlarda avoparsin yalnızca büyüme faktörü olarak kullanıldı. Danimarka'da 1996 yılında vankomisin insan tedavisi için 24 kg kullanılırken buna karşılık avoparsin hayvanlarda büyüme faktörü olarak 24.000 kg kullanıldı. Avusturya'da 1992- 1996 yılları arasında medikal amaçla vankomisin 582 kg kullanılırken avoparsin 62. 642 kg kullanılmıştır. Avoparsinin hayvanlarda büyüme faktörü olarak kullanılması sonucunda hayvansal orjinli gıdaların ve hayvanların VRE (vankomisin dirençli

enterokok) yönünden potansiyel bir rezervuar olduğu ortaya konulmuştur (Bager ve ark. 1997).

Yoshimura ve ark (1998), Japonya'da yaptıkları bir çalışmada avoparsin kullanılan 35 broyler çiftliğinden izole edilen enterokok izolatlarının %8 oranında vankomisine, avoparsine ve orienticine dirençli olduğu, avoparsin kullanılmayan broyler çiftliğinden izole edilen enterokok suşlarının ise vankomisine, avoparsine ve orienticine karşı dirençli olmadığını tespit ettiler.

Ike ve ark. (1999) tarafından 1998 yılında Japonya' ya Çin, Brezilya, Fransa ve Tayland, Vietnam ve Amerika'dan ithal edilen tavuklar ve Japon tavukları vankomisin dirençli enterokoklar yönünden araştırıldı. Elde edilen verilere göre ithal edilen Brezilya, Fransa ve Tayland tavuklarında sırasıyla %9, %33 ve %21 oranında yüksek düzey (MIC \geq 128 μ gm/ml) VRE izole edilirken Japon tavuklarında ve diğer ülkelerde yüksek düzey VRE izole edilmediği belirlendi.

Ozawa ve ark. (2002), Japonya'ya ithal edilen Tayland tavuklarında %20, Fransa tavuklarında da %30- 50 oranında VRE izole etmişlerdir. Fransa tavuklarından izole edilen yüksek düzey vankomisin ve teikoplanin dirençli enterokok suşlarında VanA genleri tespit edilmediğini, Tayland tavuklarında ise yüksek düzey vankomisin direnci ve düşük düzey teikoplanin direnci saptanmış olan suşlarda VanA tip determinantı bulunduğunu bildirdiler. Aynı zamanda iki hastanedeki üç hastadan izole edilen VRE suşlarının VanA tip determinantı ile Tayland tavuklarının VanA determinantı arasında benzerlik tespit ettiler. Tn1546 transpozonu üzerinde bulunan VanA tip vankomisin dirençli determinantların, konjugatif plazmidler aracılığı ile enterokok türleri arasında ve tavuklardan insanlara transfer olabileceğini açıkladılar.

Enterokok'larda makrolidlere karşı direnç antibiyotiğin hedefinde olan ribozomda meydana gelen metilasyon sonucu gerçekleşmektedir. Bu metilasyon MLS_B (Makrolid - linkozamid - streptograminB) fenotipi olarak adlandırılan Makrolid - linkozamid- streptograminB antibiyotiklerine karşı çapraz direncin oluşumuna neden olmaktadır. Bu MLS_B fenotipi direnci *erm* (eritromisin ribozom

metilaz) genleri tarafından meydana getirilmektedir. Bu *erm* gen proteini, 50S ribozomal alt ünitesindeki 23S rRNA'daki spesifik bir adenini metilasyona uğratarak ribozomda yapısal bir değişiklik oluşturmaktadır (Weisblum 1995).

MLS_B direnci yapısal ve indüklenebilir nitelikte olmaktadır. Yapısal MLS_B direncinde, makrolid yokluğunda bakteriler aktif metilaz mRNA üretir ve makrolid-linkozamid - streptogramin_B antibiyotiklerine karşı direnç meydana gelir. İndüklenebilir dirençte bakteriler inaktif mRNA (metilazı kodlamayan) üretirler. Bu inaktif mRNA makrolid varlığında aktif hale gelmektedir. İndüklenebilir dirençte, 14-15 halkalı makrolidlerin metilaz sentezini kuvvetle indüklemeleri nedeniyle sadece 14-15 üyeli makrolidlere karşı direnç gelişir. 16 üyeli makrolidler, linkozamid ve streptogramin B etkisini sürdürür. Enterokok'larda ribozomal metilasyonu *ermB*, *ermTR*, *ermA* genleri gerçekleştirmektedir. Ribozomal metilasyonla gerçekleşen direnç mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde görülmektedir (Horinouchi ve ark. 1983, Weisblum 1995).

Gram pozitif mikroorganizmalarda makrolid direnci, aktif pompa sistemleriyle ilacın dışarı atılmasıyla da oluşmaktadır. Aktif pompa sisteminde yer alan proteinler *msrA* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu *msrA* genleri 14- 15 üyeli makrolidlere ve streptogramin B ye karşı direnç geliştirmektedir. Bu aktif pompa sistemi ile oluşan direnç indüklenebilir özelliktedir. Eritromisin ve 14- 15 halkalı makrolidler bu direnci indüklemelerine karşın streptograminB indükleyememektedir. Yapılan araştırmalarda *msrA genleri* streptokoklarda bulunmamıştır. Streptokok'lar da bu direnci *mefA* geninin sağladığı tespit edildi (Clancy ve ark. 1996, Leclerg 2002,).

Erm genleri konjugatif ve non konjugatif transpozonlar ile plazmidler üzerinde bulunmaktadır. Bu konjugatif transpozonlar geniş bir konakçı popülasyonuna sahiptirler. Patojenik bakterilerde çoğunlukla *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *ermF* genleri bulunmuştur. Enterokok' larda yaygın bir şekilde *ermB* geni tespit edilmiştir. *Erm* genleri diğer antibiyotik dirençli genlerle özellikle tetrasikline

dirençli genlerle bağlantılı haldedir. *ErmF* geni, *tetQ* geni ile bağlantılı iken *ermB* geni *tetM* geni ile bağlantılıdır (Roberts ve ark. 1999).

Enterokok'lardaki MLS_B antibiyotiklerine karşı çapraz direncin, insan ve hayvanlarda yaygın bir şekilde olduğu ve farklı orijinler arasında benzer *ermB* genlerinin de bulunduğu ve bu genlerin insanlar ve hayvanlar arasında horizontal yolla geçtiği ortaya konuldu. Eritromisin dirençli klinikal enterokok suşlarında indüklenbilir ve yapısal makrolid direnç fenotipleri tespit edilmiştir. İndüklenbilir makrolid direncini, 14 üyeli makrolidler den çok 16 üyeli makrolidlerin indüklediği tespit edildi (Min ve ark. 2003, Leener ve ark. 2005).

Yirmidört Avrupa üniversite hastanesinin katılımı ile yapılan bir çalışmada, izole edilen 75 adet eritromisin dirençli *E.faecium* suşlarında PCR ile %93 oranında *ermB* geni varlığı tespit edildi (Schmitz ve ark. 2000). Portillo ve ark. (2000), 78 adet eritromisin dirençli enterokok suşlarının (MIC >128 µg/ml) 39 adetinde *ermB* geni bulunduğunu tespit ettiler. Lester ve ark. (2004), çoklu antibiyotik dirençli bir *E.faecium* izolatu ve duyarlı bir *E.faecium* suşu arasında dirençli genlerin konjugal transferlerini gerçekleştirdiler. Enterokoklar arasında dirençli gen transferlerinin hayvanların bağırsaklarında normal koşullar altında olabileceğini bildirdiler.

Tetrasiklin direncinde aktif pompa sistemleri ilacın dışarı atılmasını (efluks) sağlamaktadır. Efluks proteinleri, tetrasiklinlerin dışarı atılımını sağlayarak hücre içi tetrasiklin konsantrasyonlarını azaltmaktadır ve bunun sonucunda hücredeki ribozomların korunmasını sağlamaktadır. Efluks proteinleri *tet*- efluks genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu tet efluks proteinleri tetrasiklin ve minosikline direnç gösterirken glisiklinlere direnç göstermemektedir. Tet- efluks genleri 6 gruba ayrılmıştır. Grup1 tet efluks genleri *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetZ*, *tetI* ve *tetJ* genlerinden oluşmaktadır. Bunlar genellikle Gram negatif bakterilerde tetrasiklin direncine sebep olmaktadır. Grup2 tet efluks genleri *tetK* ve *tetL*, genlerinden oluşmaktadır. Bu tet genleri Gram pozitif bakterilerde tetrasiklin ve klortetrasikline direnç gösterirken minosiklin ve glisikline direnç göstermemektedir. Stafilokok'lar da grup2 tet genlerinin çoğunlukla 4.4- 4.7 kb arasında değişen küçük plazmidler

üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Mastitli ineklerden izole edilen bir streptokok suşunda *tetK* ve *tetL* genleri birlikte bulunmuştur. Grup3 *OtrB* ve *Tcr3* genlerinden oluşur ve grup2 ile benzer yapıya sahiptir. Grup4, *tetA(P)*' den oluşmaktadır ve *Clostridium spp.* türlerinde tespit edilmiştir. Grup5'te *tetV* geni bulunur ve *Mycobacterium smegmatis*' ten izole edilmiştir (Brown ve Roberts 1991, Jones ve ark. 1992, Testa ve ark. 1993, Chopra ve Roberts 2001).

Ribozomal direnç tetrasiklin direncine yol açan ikinci önemli bir mekanizmadır. *TetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS* *tetT* ve *tetW* *tetB(P)* genleri tarafından sentezlenen stoplazmik proteinin aktivitesi sonucunda ilacın ribozoma bağlanmasını engellenmektedir. Tetrasiklindeki diğer direnç enzimatik inaktivasyon ile olmaktadır. Enzimatik inaktivasyon *tetX* geni ile olmaktadır. *TetX* gen proteinleri, oksijen ve NADPH varlığında tetrasiklinin kimyasal yapısını bozarak direnç meydana getirir (Chopra ve Roberts 2001).

1949 yılında tetrasiklinlerin civcivler üzerindeki büyümeyi artırıcı etkisi keşfedilmiştir. Birleşmiş Milletler'de 1951- 1953 yıllarında tetrasiklinlerin (oksitetrasiklin-klortetrasiklin), FDA (Food and Drug Administration) tarafından yem katkı maddesi olarak kullanımına izin verildi. Bunu takiben oksitetrasiklin, Avrupa'da 1950'li, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1960'lı yıllarda yaygın bir şekilde büyütme faktörü olarak kullanıldı. Açıklanan resmi verilere göre ABD'de 1985 yılında tetrasiklin büyütme faktörü olarak 2,6 10⁶ kg kullanıldı. 1990 yılında Amerika'da 3,5 10⁶ kg, Kanada 'da 398.000 kg, Avrupa'da 2.294.000 kg, Avustralya'da 77.619 kg ve Yeni Zellanda' da 2.311 kg kullanılmıştır (Stockstad ve ark. 1949, Chopra ve Roberts 2001).

Amerika Birleşik Devletleri' nin Georgia eyaletinde Fairchild ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, tetrasiklinlerin ticari tavuk çiftliklerinde tedavi amaçlı oral yolla yaygın bir şekilde kullanılması sonucunda tavukların bağırsaklarında kommensal olarak bulunan enterokok türlerinde tetrasiklin direncinin (MIC> 8µg/ ml) meydana geldiğini ve bu tetrasiklin dirençli enterokok türlerin de *tetM* (%61), *tetL* (%25. 4), *tetK* (%1.3) ve *tetO* (%52. 5) direnç determinantları

olduğu tespit edildi. Ticari tavuk çiftliklerinde çevresel ve genetik faktörlerin etkisiyle antibiyotik direnç prevalansında artışın devam edebileceğini açıklamışlardır.

Huys ve ark. (2004), Belçika'da yaptıkları çalışmada peynirlerden izole edilen eritromisin, kloromfenikol ve tetrasiklin dirençli enterokok suşlarının tetrasiklin direncinin *tetM*, *tetL*, *tetS* genlerinden kaynaklandığını ve *TetM* geninin Tn916- 1545 konjugatif transpozonları üzerinde olduğunu bildirdiler.

A.B.D.'nin Maryland eyaletindeki ticari tavuk üretim yerlerinden izole edilen *E.faecalis* suşlarının çoğu linkozamid, makrolid ve tetrasikline direnç gösterirken *E.faecium* suşlarının çoğu florokinolonlara ve penisiline direnç göstermiştir. *E.faecium* suşlarının %63'ünde kinopristin/dalfopristine direnç ve *E.faecalis* suşlarının %7'inde de yüksek düzey gentamisin direnci olduğu tespit edildi (Hayes ve ark. 2004).

Streptograminler, molekül özelliklerine göre A ve B olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Kinopristin/dalfopristin (K/D); iki farklı streptogramin bileşiminin sinerjik etki gösteren semisentetik bir kombinasyonu olup, kinopristin; pristinamisin IA'dan elde edilen bir streptogramin B, dalfopiristin ise pristinamisin IIA'dan elde edilen bir streptogramin A'dır (Hamilton ve Ludlam 2000).

Kinopristin/dalfopristinin ortak kullanımı bakterilerde ribozomların 50S altbirimindeki 23S RNA'ya bağlanarak protein sentezini inhibe etmek sureti ile etki gösterirler. Bu etki tüm streptograminlerde olduğu gibi uzayan peptid zincirleri arasındaki peptid bağlarının oluşumununun bloke edilmesi şeklindedir. Dalfopristin protein sentezinin erken basamağına, kinopristin ise geç basamağına etkilidir. Dalfopiristin peptid zincir yapımının inhibisyonu ile ribozomda değişikliğe neden olur ve kinopristinin ribozoma bağlanmasını kolaylaştırır. K/D kombinasyonunun antibakteriyel etkinliği her bir bileşiğin tek tek etkinliğinden yaklaşık 16 kat daha fazladır. Bu sinerjik etki nedeniyle protein sentezi inhibitörü olan birçok

antibiyotiğin aksine genellikle bakteriostatik değil bakterisidal etki gösterir (Declercq ve ark. 1992, Nicholls ve ark. 1999, Ulusoy 2004).

MLS_B (Makrolid - linkozamid - streptograminB) grubu antibiyotiklere karşı sık görülen bir direnç mekanizmasıdır. Meydana gelen değişiklik ribozomdaki ortak bağlanma noktasındaki metilasyondur. Bu dirençten kinopristin etkilenirken dalfopristin ribozomal değişiklikten etkilenmediği için K/D kombinasyonun da bu tür direnç görülmez. K/D kombinasyonuna direnç oluşması için kombinasyonda yer alan iki bileşiğin birlikte etkilenmesi gerekmektedir. Sadece bir bileşiğe karşı oluşan dirençte antibiyotik bakteriyostatik etki göstermektedir. MLS_B direnci *erm* genleri aracılığı ile olmaktadır. 23s rRNA da bulunan dimetilaz enzimini kodlayan bu genler makrolid linkozamid ve streptogramin B bağlanmasını engellemektedir. Hidrolaz enzimini kodlayan (streptogramin inaktive eden enzim) *vgb*, *msrA* genleri streptograminB direncinden sorumludurlar. Asetiltransferaz enzimini kodlayan *vat* ve *vatB* genleri (Sat genleri) streptogramin A direncinden sorumludurlar. Aynı zamanda *vga* genleri de streptogramin direncinden sorumludurlar. Kinopristini inaktive eden hidrolaz ve dalfopristini inaktive eden asetil transferaz enzimlerinin bazı enterokok türlerinde olduğu tespit edildi. Aktif pompa sistemleri (effluks) aktif olarak ilacın dışarı atılmasını sağlayan sistemdir. Genellikle koagulaz negatif stafilokoklarda görülmüştür. *E.faecium*'da da bildirilmiştir (Linden ve ark. 2001, Ulusoy 2004).

Kinopristin/dalfopristin'e karşı *E.faecalis* suşlarının *E.faecium* suşlarından daha dirençli olduğu bilinmektedir. *E.faecalis* streptograminlere karşı doğal dirençli olarak kabul edilmektedir. *E.faecalis*'te bulunan *Lsa* geni kinopristin/dalfopristin ve Linkozamid-StreptograminA fenotipi (LS_A) direncinden sorumludur. Kinopristin/dalfopristin direncini *E.faecalis* türünde bulunan *Isa* geni aktif pompa sistemleri ile (effluks) ilacın dışarı atılmasını sağlayarak direnç gelişimine neden olabildiği bildirilmesine rağmen bu direnç mekanizmasının tam olarak açıklığa kavuşmadığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Isa* benzeri gen bulunan klinikal *E.faecalis* izolatlarının kinopristin/dalfopristine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sımjee ve ark. (2002), tavuk ürünlerinden izole ettikleri *E.faecalis* suşlarında

streptogramin dirençli *VatE* genleri olduğunu belirlediler. Bu *VatE* genlerinin plazmidler aracılığı ile konjugasyonla *E.faecium* suşlarına transfer olduğunu ve *E.faecium* suşlarındaki streptogramin direncinden sorumlu *VatE* genlerinin yayılmasında *E.faecalis* suşlarının önemli bir rezervuar olabileceğini bildirdiler (Rende ve ark. 1993, Singh ve ark. 2002, Dina ve ark. 2003, Hershberger ve ark.2004).

Streptogramin grubuna dahil olan virjinamisin 1999 yılından önce Avrupa ülkelerinde sığır, domuz, broyler ve hindi çiftliklerinde büyütme amaçlı olarak kullanıldı. Virjinamisin Amerika ve diğer ülkelerde 1999 yılından sonra da büyütme faktörü olarak kullanılmaya devam edildi. Virjinamisin aynı zamanda tavuklarda *C.perfringens*'in neden olduğu nekrotik enteritisi ve tavuk ve hindilerde koksidiyosisi önlemek amacıyla da kullanılmıştır (Shuford ve Patel 2005).

Danimarka'da ve Hollanda'da virjinamisinle beslenen broyler ve domuz çiftliklerinden izole edilen enterokok suşlarında streptogramin direnç genleri tespit edilmiştir. Almanya'da 1995- 1996 yıllarında farklı orjinlerden toplanan 150 adet *E.faecium* izolatının vankomisin ve kinopristin/dalfopristin direnci incelenmiştir. Virjinamisin ve avoparsin kullanılan domuz çiftliklerinden izole edilen 4 adet *E.faecium* izolatının kinopristin/dalfopristine dirençli olduğu bulundu. Vankomisine dirençli 3 adet izolatın ise kinopristin/dalfopristine (MIC 8 mg/L) dirençli olduğu görüldü. Kinopristin/dalfopristin'e dirençli izolatlarda *satA* direnç genleri bulunmuştur (Thal ve Zervos 1999, Wegener ve ark. 1999).

Enterokok'larda streptogramin A direncini, *satA* genleri oluşturmaktadır. İnsan ve kanatlı orjinli *E.faecium* izolatlarından *satA* direnç genleri tespit edilmiştir. Bu direnç genlerinin hem insanda hemde kanatlılarda bulunması, farklı ekosistemler arasında bu dirençli genlerin bakteriler arasında transfer olduklarını ortaya koymuştur (Werner 1999).

A.B.D. eyaletlerinden Maryland'teki tavuk çiftliklerinde virjinamisin büyütme amaçlı ve klostridium infeksiyonlarından korunmak amacıyla kullanılmıştır. Virjinamisin kullanılan tavuk çiftliğinden toplanan 67 adet dışkıdan

izole edilen 41 adet *E.faecium* izolatının 21 tanesi (%51.2) kinopristin/dalfopristine dirençli çıkmıştır. Bununla birlikte kümes çöplükleri örneklerinde %78 oranında kinopristin/dalfopristine direnç görülmüştür. Tavuklardan elde edilen yüksek düzey dirençli *E.faecium* suşlarının vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde kullanılan kinopristin/dalfopristin için önemli bir direnç rezervuarı olduğu tespit edilmiştir. Aynı bölgede 2005 yılında yapılan bir çalışmada tavuk çiftlikleri çevrelerinden izole edilen *E. faecium* suşlarının %63'ünün kinopristin/dalfopristine dirençli olduğu belirlendi. Streptogramin dirençli izolatlarda *ermA* (%6) ve *ermB* (%10) direnç genleri ile makrolid ve linkosamide dirençli bir izolatta *msrC* direnç geni tespit edilmiştir. Bu *E.faecium* izolatlarından *vgbA* (streptogramin B hidrolaz) ve *vatD-vatE* (streptogramin A asetiltransferaz) direnç genleri bulunamamıştır (Hayes ve ark. 2001, Hayes ve ark. 2005).

İngiltere'nin güney batısında bulunan Cornwall'ın kırsal kesimindeki kirli sulardan (6 adet) ve dışkılarından (4 adet) yüksek düzey virjinamisin M1 dirençli *E.faecium* (MIC 32mg/L) izolatları tespit edilmiştir. Bununla birlikte klinik örneklerden (dışkı-ürin), kirli sulardan ve çiğ etlerden izole edilen *E.faecium* izolatlarında kinopristin/dalfopristin direnci görülmemiştir. Almanya, Danimarka ve Batı Avpupa' da yapılan çalışmalarda hospitalize insanlarda, sağlıklı insan, hayvan ve çiğ etlerden izole edilen *E.faecium* suşlarında kinopristin/dalfopristin direncinden sorumlu Vat E genleri varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda *VatD* direnç geninin *E.faecium* suşları arasında transfer olduğu ortaya çıkmıştır (Solway ve ark. 2003, Hershberger ve ark. 2004).

Bakterilerde kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç iki mekanizma aracılığı ile olmaktadır. Bunlar kinolon hedef bölgesinin değişikliğe uğraması ve aktif pompa sistemiyle ilacın dışarı atılmasıdır. Hedef enzimdeki değişiklik *gyrA* genindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişir ve yüksek düzey kinolon direncine neden olmaktadır. *GyrB* genindeki mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan direnç tüm kinolonlara karşı olmayabilmektedir. Kinolonlardaki direnç mekanizması genellikle kromozomal kaynaklı olup bunun yanında mobil genetik elementlerin kinolon direncinden sorumlu *qnr* genlerini taşıdığı tespit edilmiştir. Bu mobil genetik

elementler kinolon direnç genlerinin potansiyel bir horizontal transferlerini sağlamaktadırlar (Ruiz 2003).

Linezolid, oksazolidinon grubunun yeni bir antibiyotik üyesidir. Oksazolidinonlar 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Bu etkilerini ribozom alt ünitelerinin birleşerek, 70S ribozom kompleksini oluşturmasını engelleyerek yaparlar. Laboratuvar ve klinik kullanımda nadiren *Enterococcus faecium* ve *Staphylococcus aureus*'ta dirençli mutant gelişimi gözlenebilmektedir. Bunlar sıklıkla 23S ribozomun V. bölgesinde gelişen değişik mutasyonlara bağlanmıştır. Şu ana dek ilacın inaktivasyonu yolu ile oluşan bir direnç mekanizması saptanmamıştır. Amerika'da Ulusal Nozokomiyal Sörveyans Sistemi tarafından yapılan çalışmada son on yıldır vankomisin dirençli enterokokların neden olduğu bakteriyemilerin 20 kat arttığı bildirilmiştir. Vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde yeni bir antibiyotik olan linezolid kullanılmaktadır. Linezolid klinikte sınırlı kullanılmasına rağmen İngiltere, Avusturya ve Yunanistan'da kısa zamanda linezolid dirençli enterokok suşlarının tespit edildiği rapor edildi (Bersos ve ark. 2004, Korten 2004).

Prytstowsky ve ark. (2001), linezolidin kullanımı boyunca direncin oluşup oluşmadığını tespit etmek için vankomisin dirençli 10 tane enterokok izolatı (4 adet *E.faecalis*, 5 adet *E.faecium*, 1 adet *E.gallinarum*) kullanmışlardır. Enterokok suşları 12 kez linezolid dilüsyonları ile muamele sonucunda VRE *E.faecium* suşlarından daha çok *E.faecalis* suşları arasında linezolid direnci geliştiği görülmüştür. *E.faecalis* suşlarının final MIC değerleri 32- 128µg/ml iken *E.faecium* suşlarının MIC değerleri 2-16µg/ml *E.gallinarum* suşunun MIC değeri 8µg/ml çıkmıştır. Bu durum VRE *E.faecalis* suşlarında linezolid direncinin daha hızlı geliştiğini gösterdi.

Rifampin ansamisin grubunda yer alan yarı sentetik bir antibiyotiktir. Rifampinler güçlü bir bakterisid etkiye sahip antibiyotiklerdir. Rifampin DNA'ya bağlı RNA polimeraz enziminin β -alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Rifampin direnci β -alt birimini kodlayan gendeki nokta

mutasyonları sonucunda oluşur. Mutasyonlar çok yüksek sıklıkla oluşmaktadır (Görenek 2007).

Enterokok'lar konjugasyon yoluyla bir suştan diğer suşa transfer olabilen genetik elementlere sahiptirler. Enterokokkal plazmidler Gram pozitif bakteriler arasında geniş bir konakçı dağılımı gösterirler. Enterokok'ların sahip oldukları bu plazmidler virülens faktörlerini kodlayabilirler veya antimikrobiyal direnç genlerini taşıyabilmektedirler. Plazmid içeren enterokokların antimikrobiyal dirençle bağlantısı ilk kez Courvalin tarafından 1972 yılında ortaya konuldu. 1974 yılında Jacob ve Hobbs *E.faecalis* JH1 suşunda plazmid kodlu antimikrobiyal dirençli determinantların buyyon ortamında konjugasyonla aktarılabilceğini rapor etmişlerdir (Clewel 1990).

Enterokoklar tür içi ve türler arasında ve diğer bakteriler arasında genetik madde aktarımı yapabilme kapasitesine sahiptirler. Enterokoklar bu aktarımı üç farklı konjugatif sistemle gerçekleştirmektedir. Birincisi enterokoklara özgü olan konjugatif plazmidlerdir. Bu plazmidler agar ve buyyonda yüksek oranda transfer olurlar. İkincisi enterokok ve diğer bakteriler arasında olan transfer olabilen plazmidlerdir. Üçüncüsü konjugatif transpozonlar aracılığı ile olan genetik madde aktarımıdır (Mundy ve ark. 2000).

E.faecalis DS5 suşundan izole edilen plazmid pAM β 1'in geniş konakçı dağılımına sahip olduğu ve pek çok Gram pozitif bakterilere agar ortamında transfer olabildiği tespit edildi. Bu 26 kb olan plazmid eritromisin direncini kodlamaktadır. Bu plazmid, sadece *erm* determinantını kodlamasına rağmen makrolid-linkozamid-streptograminB (MLS)' ye direnç gösterir. MLS fenotipi, Gram pozitif türleri arasında pek çok *erm* determinantları için yaygındır. Diğer *E.faecalis* plazmidleri pAM81 ve pAM490 Gram pozitif bakterilerde geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler (Clewel 1990).

Genotipik tiplendirme metotlarından olan plazmid analiz yöntemi enterokokların DNA tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır (Donabedian ve ark. 1992).

Plazmid profil analiz yönteminde bakterilerin plazmid DNA'sı ekstrakte edilir ve agar jel elektroforez işlemine tabi tutulur. İzolatların sahip olduğu plazmidlerin sayı ve büyüklükleri tespit edilerek suşlar birbirinden ayrılabilir. Bu nedenle plazmid profil analizi; özellikle kısa süre içerisinde belirli bir bölgedeki salgına ait izolatların değerlendirilmesinde tercih edilebilir bir tiplendirme yöntemi olarak yarar sağlamaktadır (Arbeit 1999).

Plazmid analizine göre tiplendirmede bazı problemler de ortaya çıkabilmektedir. Plazmidlerin büyüklükleri doğru olarak ölçülse bile, aynı büyüklükteki plazmidler biyolojik farklılığa sahip olabileceklerinden suşlar arasında bu yöntemle ayrım yapılamayabilir. Aynı kromozomal genotipe sahip ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar, tüm plazmidini kaybetmesi, yeni plazmid kazanması veya plazmid yapısında yeni bir düzenleme nedeniyle çok farklı plazmid profili gösterebilirler. Buna karşın farklı suşlar da aynı plazmid profiline sahip olabilirler (Johnson ve ark. 1998, Şener ve ark. 2004).

Bu çalışmada, Entansif Broyler İşletmeleri ile Kırsal Tavukçuluk İşletmelerindeki hayvanların intestinal florasındaki enterokok türlerinin varlığı, yaygınlığı, biyotipleri ve izole edilen suşların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik özellikleri ile plazmid profillerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Ankara ve Kırıkkale ili çevresinde bulunan ticari broyler işletmeleri ve kırsal tavukçuluk aile işletmeleri Mayıs 2005 ve Kasım 2005 tarihleri arasında ziyaret edildi. Özel sektöre ait 8000-15000 kapasiteli 4 adet ticari broyler işletmelerinden 400 adet, kapasitesi 10-50 adet arasında değişen 19 adet köy tavuğu kümeslerinden (Haymana, Karakeçili, Balışeyh, Çelebi) 304 adet kloakal svap ile dışkı örnekleri toplandı. Toplanan örneklerden enterokokların izolasyon ve identifikasyonu yapıldı. İdentifiye edilen enterokok suşlarına antibiyogram yapılarak çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilikleri belirlendi. Çeşitli antibiyotiklere dirençli 50 adet enterokok suşunun plazmid profil analizi yapıldı.

2.1. Örneklerin Alınması

Broyler kümeslerinin bütünlüğünü temsil edecek şekilde 1-2 metre aralıklarla kümesin her noktasından rastgele tutulan 4-5 haftalık broylerin kloakasından steril svap yardımıyla dışkı örnekleri alındı. Köy tavuklarından ise kümeste bulunan bütün tavukların kloakasından steril svap ile dışkı örnekleri toplandı. Her iki tip işletmelerden alınan dışkı örnekleri soğuk şartlar altında en kısa zamanda laboratuvara getirildi.

2.2 İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları

2.2.1. Besi yerleri

Enterokok izolatlarının izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında, Slanetz-Bartley agar (Oxoid), Brain Heart Infusion agar (Difco), Bile-Esculin-Agar (Difco), Brain Heart Infusion Broth (Difco), Motility Test Medium (Difco), Moeller Decarboxylase Broth (Difco) ve Heart Infusion Broth (Difco) besi yerleri kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan besi yerleri sterilite kontrolü için bir gece 37 °C'de bekletildikten sonra kullanılmaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

Kırby Bauer disk difüzyon testi için Müeller Hinton Agar (Merck) besi yeri kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan Müeller Hinton Agar 15 cm çapındaki petrilere 4mm kalınlığında döküldü. Hazırlanan besi yerleri sterilite kontrolü için bir gece 37 °C’de bekletildikten sonra +4 °C’de buzdolabında saklandı.

2.2.2. Enterokokların İzolasyon ve İdentifikasyonu

Enterokok’ların izolasyon ve identifikasyonları Facklam ve Collins (1989)’in belirttiği yönteme göre gerçekleştirildi.

Laboratuvara getirilen kloakal svap örnekleri Slanetz-Bartley agar besi yerine ekilerek 44- 45°C’de aerobik koşullarda 48 saat inkube edildi. Bu süre sonunda üreyen vişne renkli koloniler seçilerek identifikasyon çalışmaları için Brain Heart Infusion Agar besi yerine pasajları yapıldı.

İzole edilen enterokok şüpheli izolatlara Gram boyama, katalaz testi, safra eskülin testi, PYR testi, %6.5 luk NaCl’ de üreme testi uygulanarak *Enterococcus spp.* olarak cins düzeyinde adlandırıldı.

2.2.2.1. Katalaz testi: Brain Heart Infusion agarda üretilmiş 24 saatlik saf bakteri kültüründen öze ile lam üzerine konuldu. Lam üzerine bir damla %3 lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatıldı. Hava kabarcıkları oluşturmayan suşlar katalaz negatif olarak değerlendirildi ve çalışmaya alındı (Koneman ve ark.1997).

2.2.2.2. Safra eskülin testi: Bu test için hazır olarak temin edilen Bile-Esculin-Agar (Difco) kullanıldı. Bu besiyerine 24 saatlik saf bakteri kültüründen ekim yapıldı. 35°C de 24- 48 saatlik inkubasyon sonunda besiyerinde üreyen ve eskülini hidrolize ederek siyah renk oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark. 1997).



Resim 1.1 : Safra- eskülin testi

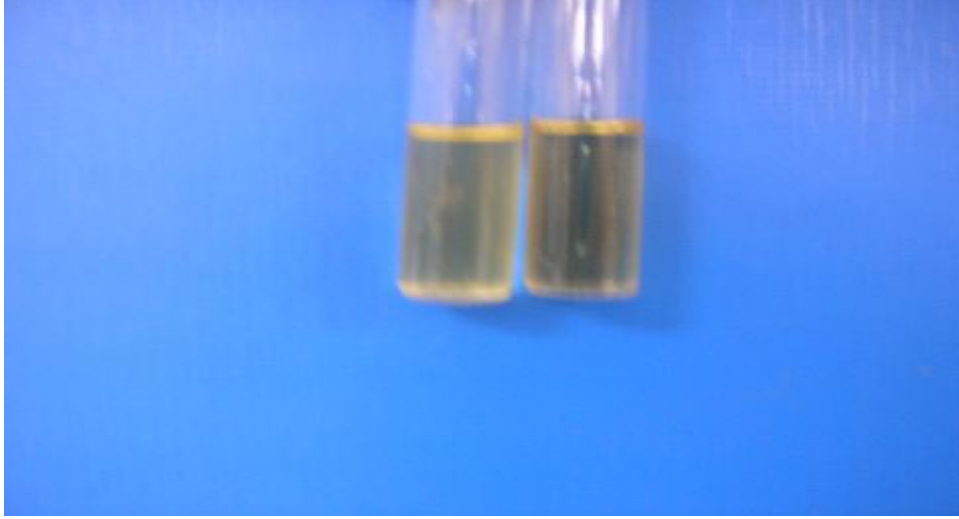
2.2.2.3. Pirolidonil- β - naftilamid (PYR) testi: PYR (Sigma) emdirilmiş filtre kağıdı üzerine 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni konulduktan sonra bir damla PYR ayıracı (%0.015 p-dimetylaminocinnamaldehyde, sigma) damlatılarak 2 dakika inkubasyona bırakıldı. Pembe renk veren suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Gordon ve ark. 1987).



Resim 1.2 : Pirolidonil- β - naftilamid (PYR) testi

2.2.2.4. %6.5 luk NaCl de üreme testi: Şüpheli koloniden öze ile %6.5 NaCl (Merck) içeren BHI (Difco) buyyonu içerisine ekim yapılarak 35°C de 24-72 saat

inkube edildi. Buuyonda üreme sonucu bulanıklık oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 2002).



Resim1.3: %6.5 luk NaCl de üreme testi

Enterococcus spp suşlarının tür düzeyinde identifikasyonları için arjinin testi, hareket testi, pigmentasyon testi, piruvat testi, karbonhidrat fermantasyon testlerinden yararlanıldı.

2.2.2.5. Arjinin dekarboksilasyon testi: Bu test için % 1 arjinin içeren ve arjinin içermeyen Moeller Decarboxylase Broth (Difco) kullanıldı. 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir- iki koloni, arjinin içeren ve arjin içermeyen besi yerlerine ekildi. Her iki besi yerine 2 ml kalınlığında steril sıvı parafin dökülüp, 35°C’de 18- 24 saat inkube edildi. Pozitif suşlar besi yerini mavi- mor renge dönüştürürken negatif suşlar besi yerini sarı renge dönüştürdü (Koneman ve ark. 1997).



Resim 1.4: Arjinin dekarboksilasyon testi

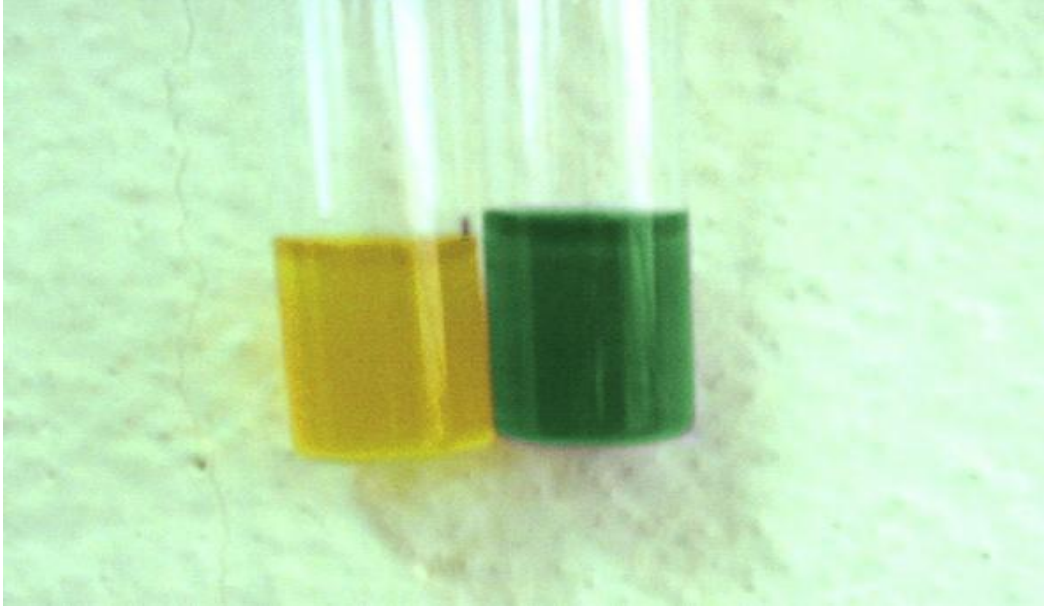
2.2.2.6. Hareket testi: %1' lik trifenil tetrazolium kloride (TTC) solusyonu ilave edilen Motility Test Medium (Difco) kullanıldı. 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni iğne uçlu öze ile dik olarak besi (tüplere) yerine ekildikten sonra 37°C'de 24 saat aerobik atmosferde inkube edildi. Hareket pozitif olan suşlar trifenil tetrazolimu (TTC) indirgeyerek ekim hattı dışına doğru yayılma gösterdi. Hareket negatif olan suşların sadece ekim hattı boyunca ürediği belirlendi (Bilgehan 2002).



Resim 1.5: Hareket testi

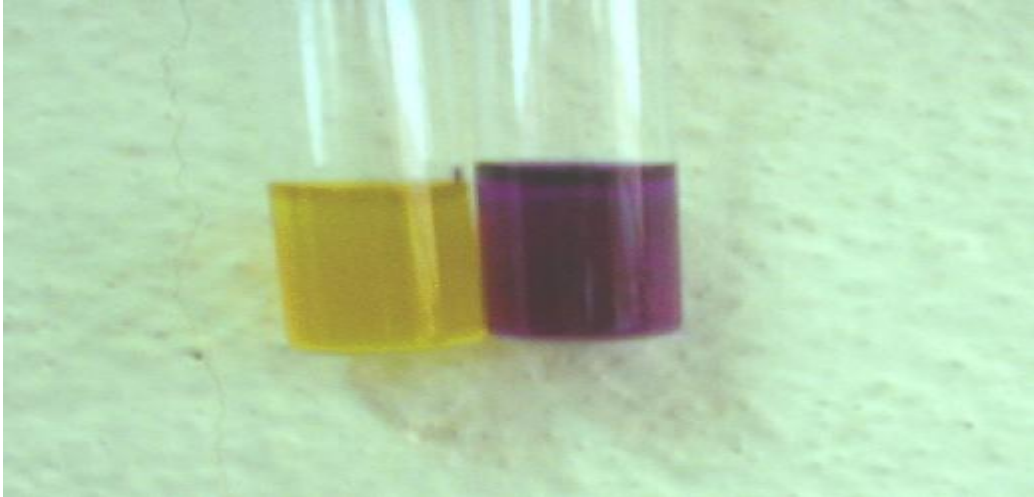
2.2.2.7. Pigmentasyon testi: Enterokok suşlarının pigment yapımı Brain Heart Infusion agara (Difco) ekilerek araştırıldı. Ekilen besi yerleri 37°C'de 24 saat aerobik atmosferde inkube edildi. Steril pamuklu svapla kolonilerin pigmentasyonuna bakıldı. Pozitif suşlar sarı renk verirken negatif suşlar krem, beyaz renkler verdi (Facklam ve Collins 1989).

2.2.2.8. Piruvat testi: Tryptone 10g, Yeast extract 5 g, K_2HPO_4 5 g, NaCl 5 g, Sodium salt of pyruvic acid 10 g, Bromthymol blue 0.04 g kimyasal maddeler (Merck) kullanılarak piruvatlı besi yeri hazırlandı. 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni piruvatlı besi yerine süspanse edilip 35°C' de 16-18 saat inkubasyona bırakıldı. Normalde yeşil renkli olan besi yerinin sarı renge dönüşmesi pozitif olarak, aynı kalması negatif olarak değerlendirildi (Gross ve ark. 1975).



Resim 1.6: Piruvat testi

2.2.2.9. Karbonhidrat fermentasyon testi: Heart Infusion Broth'a (Difco) %1 olacak şekilde karbonhidratlar [mannitol, arabinoz, rafinoz, laktoz (Merck)] ve Bromkreosol purpur katılarak besiyeri hazırlandı. 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni karbonhidratlı besi yerine süspanse edilip 37°C' de 3-7 gün inkubasyona bırakıldı. Normalde mavi olan besi yerinin sarı renge dönüşümü pozitif olarak, aynı kalması negatif olarak değerlendirildi (Facklam 1972).



Resim 1.7: Karbonhidrat Fermentasyon testi

2.3 Antibiyotik Duyarlılık/Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

İdentifiye edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları/dirençlilikleri CLSI'nın (Clinical Laboratory Standarts Institute) belirttiği kriterlere göre Müeller Hinton Agar'da (Merck) disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirildi (CLSI 2003).

BHI agar (Difco) besiyerinde üretilmiş 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni alınarak 2 ml steril fizyolojik su içeren tüplerde 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan steril swab yardımıyla 15 cm çapında petrilere 4mm kalınlığında olacak şekilde hazırlanan Mueller Hinton agar besi yerinin yüzeyine uygun şekilde yayıldı. Daha sonra antibiyotik emdirilmiş diskler (Oxoid) (Clinical Laboratory Standarts Institute USA standardında belirtilen antibiyotikler Penisilin 10 U, Vankomisin 30µg, Teikoplanin (TEC) 30µg, Eritromisin 15µg, Tetrasiklin 30µg, Enrofloksasin 5µg, Rifampin 5µg, Kinopristin/dalfopristin 15µg, Linezolid 30µg, Gentamisin 120µg, Streptomisin 300µg) uygun şekilde yerleştirildi ve 35°C'de 18- 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda inhibisyon zonları ölçülerek CLSI standartlarında belirtilen zon çaplarına göre değerlendirildi.



Resim 1.8: Antibiyogram

2.4. Plazmid Profil Analizi

Çeşitli antibiyotiklere dirençli 43 broyler ve 7 köy tavuğu enterokok suşlarının plazmid profilleri Şener ve ark. (2004) tarafından açıklanan yöntemle göre gerçekleştirildi.

2.4.1. Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Etidyum Bromid: 10 mg/ml (steril distile su içinde)

Lizostafin: 1 mg/ml (steril distile su içinde)

Lizozim: 100 mg/ml (steril distile su içinde)

Ribonükleaz A: 10 mg/ml (steril distile su içinde)

Süpersarmal ölçü birimi: 2067-16210 bp arası

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): %10 (Steril distile su içinde-w/v)

10X TBE: Tris 108 gr/lt

Borik asid 55 gr/lt

EDTA 20 ml/lt [0.5 M (pH: 8.0)]

NaCl-EDTA: NaCl (MERK/ABD) 2.5 M

EDTA 50 mM (pH:7.5)

Yükleme tamponu

Sukroz: %40 (distile su içinde, w/v)

Orange-G : % 0.25 (w/v)

2.4.2. Plazmid DNA İzolasyonu

Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid) agar besiyerinde saf kültür halinde üretilen suşlardan, bir koloni 3 ml Triptone Soya Broth (TSB, Oxoid) sıvı besiyerine pasajlanarak, 37°C'de normal atmosferik şartlarda bir gece inkube edildi. TSB' deki bakteri süspansiyonundan 1000 µl'si santrifüj tüplerine alınarak 6000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Üstteki süpernatant boşaltıldı ve elde edilen bakteri pelleti üzerine 50 µl lizostafin, 30µl lizozim, 25 µl ribonükleazA ve 295 µl Sodyum klorür- Etilen Diamin Tetra Asetikasit (NaCl- EDTA) çözeltilerinden ilave edilerek

süspanse edildi. Elde edilen süspanسیون 30 dakika süreyle 37°C'de inkube edilmesini takiben, üzerine 400 µl % 10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ilave edilerek altüst edildi. Karışım 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Plazmid analizi için üst sıvıdan 300 µl alınarak başka bir tüpe aktarıldı.

2.4.3. Plazmid Profil Analizleri

Plazmid profil analizi agar jel elektroforez yöntemi kullanılarak (Biorad) gerçekleştirildi. Plazmidlerin incelenmesi 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 0.8'lik agaroz (sigma) jelde gerçekleştirildi. Jel, 0.5X Tris- Borik asit- Etilen Diamin Tetra Asetikasit (TBE) tamponuyla hazırlandı. Jelin ilk veya ortadaki kuyucuğuna kontrol amacıyla 2.5 µl standart süpersarmal ölçü birimi (2067- 16210 bp'lik) (DNA Ladder, Supercoiled, sigma), diğer kuyucuklara ise analiz amacıyla 20 µl plazmid DNA'sı içeren süpernatant, yükleme tamponuyla (Sukroz: %40 distile su içinde, Orange-G : % 0.25 (w/v)) karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez işlemi 90V'da 3 saat süreyle sürdürüldü. Plazmid bant görüntüleri UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi (Biorad-ABD) ile incelendi. Görüntü analizi "Quantity One" yazılımı (Biorad-ABD) program yardımıyla bilgisayar ortamına aktarılarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

400 adet broyler dışkısından 229 adet (%57.25) ve 304 adet köy tavukları dışkısından 143 adet (%47.03) enterokok suşu izole edildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Enterokok suşlarının izole edildiği dışkı materyalinin dağılımı ve izolat sayısı

Orijini	Türü	Materyal sayısı	İzolat sayısı	İzolasyon yüzdesi
Broyler (4 kümes)	Kloakal svap	400	229	%57.25
Köy Tavukları(19 kümes)	Kloakal svap	304	143	%47.03

Broyler ve köy tavuklarından izole edilen 372 adet enterokok suşlarının %54.3' ünün (202 adet) *E.faecium*, %22.3' ünün (83 adet) *E.gallinarum*, %14.7' sinin (55 adet) *E.faecalis*, % 4.3' ünün (16 adet) *E.mundti*, %1.6' sının (6 adet) *E.casseliflavus*, %1' inin (4 adet) *E.raffinosis*, %1' inin (4 adet) *E.durans*, %0.2' sinin (1 adet) *E.solitarius* ve %0.2' sinin (1 adet) *E.hirae* türlerine ait olduğu belirlendi (Çizelge 2.2).

Broyler dışkısından izole edilen 229 adet enterokok izolatından %42.35 (97 adet) *E.faecium*, %34.93 (80 adet) *E.gallinarum*, %18.34 (42 adet) *E.faecalis*, %2.18 (5 adet) *E.casseliflavus* %0.87 (2 adet) *E.raffinosis*, %0.43 (1 adet) *E.durans*, *E.solitarius* ve *E.mundtii* türleri tespit edildi (Çizelge 2.2).

Köy tavukları dışkısından izole edilen 143 adet enterokok izolatından %73.42 (105 adet) *E.faecium*, %10.48 (15 adet) *E.mundtii*, %9.09 (13 adet) *E.faecalis*, %2.09 (3 adet) *E.gallinarum*, %2.09 (3 adet) *E.durans*, %1.39 (2 adet) *E.raffinosis*, %0.69' unun (1adet) *E.casseliflavus* ve *E.hirae* türleri bulundu (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Enterokok suşlarının orijini, biyotipleri ve dağılım oranları

Mikroorganizmalar	Broyler		Köy Tavukları		Toplam	
	Dışkı (adet)	Oran %	Dışkı (adet)	Oran %	Dışkı (adet)	Oran %
<i>E.faecalis</i>	42	%18.34	13	%9.09	55	%14.78
<i>E.faecium</i>	97	%42.35	105	%73.42	202	%54.30
<i>E.gallinarum</i>	80	%34.93	3	%2.09	83	%22.31
<i>E.casseliflavus</i>	5	%2.18	1	%0.69	6	%1.61
<i>E.raffinusus</i>	2	%0.87	2	%1.39	4	%1.07
<i>E.mundtii</i>	1	%0.43	15	%10.48	16	%4.30
<i>E.durans</i>	1	%0.43	3	%2.09	4	%1.07
<i>E.solitarius</i>	1	%0.43	-	-	1	%0.2
<i>E.hirae</i>	-	-	1	%0.69	1	%0.2
Toplam	229	%57.25	143	%47.03	372	%52.8

Broyler ve köy tavukları enterokok izolatlarının penisilin, vankomisin, teikoplanin, eritromisin, tetrasiklin, enrofloksasin, rifampin, kinopristin/dalfopristin, linezolid, gentamisin, streptomisin antibiyotiklerine karşı duyarlılık/dirençlilikleri disk difüzyon yöntemine göre yapıldı.

Broyler *E.faecalis* izolatlarının kinopristin/dalfopristine %90.4 (38 adet) dirençli ve %9.5 (4 adet) orta duyarlı, diğer enterokok suşlarının ise %20.8 (39 adet) oranında dirençli olduğu saptandı. Tüm enterokok suşlarının %33.6 (77 adet) oranında dirençli olduğu belirlendi (Çizelge 2.3).

229 adet broyler enterokok suşunun penisiline %5.6 (13 adet), tetrasikline %72 (165 adet), eritromisine %59.3 (136 adet), enrofloksasine %8.7 (20 adet), rifampine %10.9 (25 adet), vankomisine %0.4 (1 adet), yüksek düzey gentamisine %23.1 (53 adet) ve yüksek düzey streptomisine %6.5 (15 adet), oranında dirençli oldukları saptandı. Broyler enterokok izolatlarının tümünün (229 adet) linezolid ve teikoplanin antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlendi (Çizelge 2.4).

229 adet broyler enterokok suşunun 179 adetinin (%78.1) tekli veya çoklu antibiyotik dirençli olduğu tespit edildi. Dirençli enterokok suşlarının 53 adetinin (%23.1) tek antibiyotiğe dirençli, 47 adetinin (%20.5) iki antibiyotiğe dirençli, 40 adetinin (%17.4) üç antibiyotiğe dirençli, 19 adetinin (%8.2) dört antibiyotiğe

dirençli, 11 adetinin (%4.8) beş antibiyotiğe dirençli ve 9 adetinin de (%3.9) altı antibiyotiğe dirençli oldukları belirlendi. Çoklu antibiyotik direncinin en fazla *E.faecium*, *E.gallinarum* ve *E.faecalis* türlerinde olduğu bulundu.

Köy tavukları *E.faecalis* izolatlarının kinopristin/dalfopristine %53.8'inin (7 adet) dirençli, %23'ünün (3 adet) orta duyarlı ve %23'ünün (3 adet) duyarlı olduğu belirlendi. Diğer enterokok türlerinin kinopristin/ dalfopristine karşı duyarlı olduğu görüldü (Çizelge 2.3).

143 adet köy tavukları enterokok suşunun, 3 adedi (%2) tetrasikline, 3 adedi (%2) eritromisine ve 2 adedi (%1.39) enrofloksasine karşı direnç gösterdi. Tüm suşların linezolid, gentamisin, streptomisin, penisilin, vankomisin, teikoplanin ve rifampin antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları tespit edildi (Çizelge 2.4).

Köy tavukları örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının 15 adetinin (%10.4) tek antibiyotiğe dirençli olduğu belirlendi.

Çizelge 2.3 Enterokok suşlarının kinopristin/ dalfopristin (15µg) dirençlilik /duyarlılık oranları

Mikroorganizma	Broyler			Köy Tavukları		
	R	I	S	R	I	S
E.faecalis	38 %90.4	4 %9.5	0	7 %53.8	3 %23	3 %23
Diğer enterokok suşları	39 %20.8	34 %18.1	112 %59.8	0	0	130 %100
Toplam	77 %33.6	38 %16.5	112 %48.9	7 %4.8	3 %2.0	133 %93.0

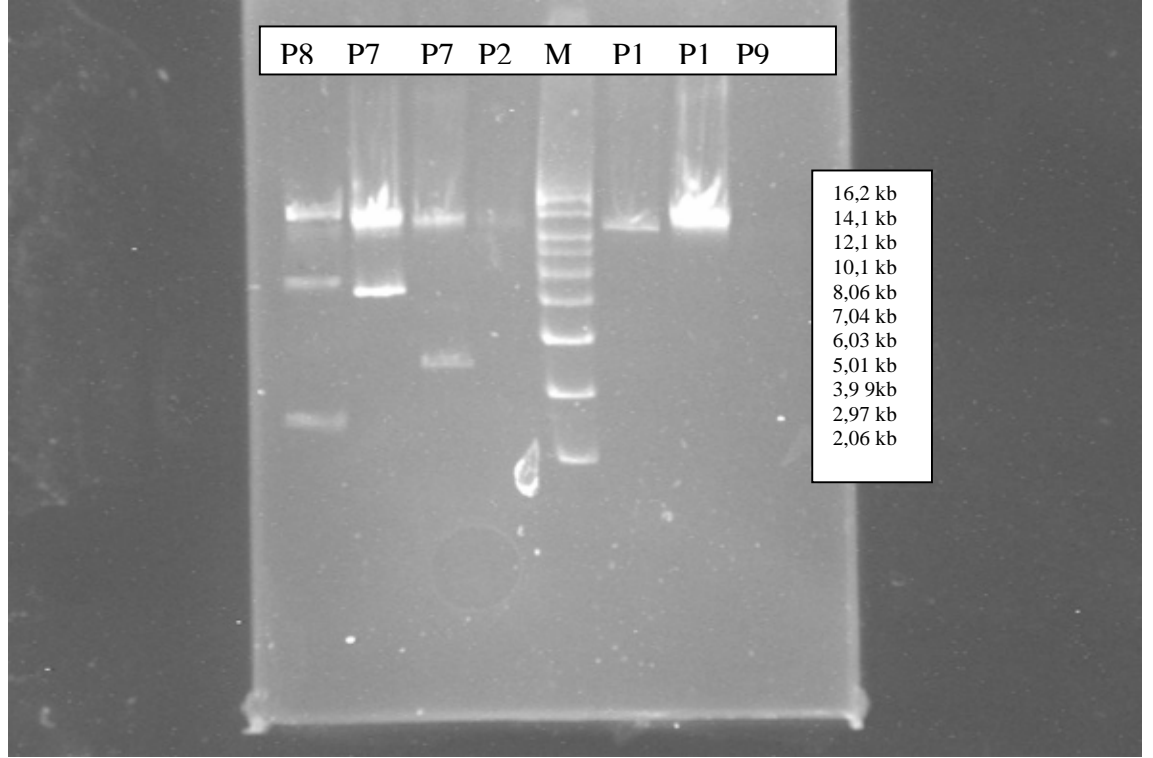
R: Resistant (dirençli), I: Intermediate (orta duyarlı), S: Sensitive (duyarlı)

Çizelge 2.4 Enterokok suşlarının antibiyotik dirençlilik /duyarlılık oranları

Antibiyotik	Broyler			Köy Tavukları			Toplam		
	229 adet			143 adet			372 adet		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Penisilin 10 U	13 %5.6	0	216 %94.3	0	0	143 %100	13 %3.4	0	359 %96.5
Vankomisin 30µg	1 %0.4	0	228 %99.5	0	0	143 %100	1 %0.26	0	371 %99.7
Teikoplanin 30µg	0	0	229 %100	0	0	143 %100	0	0	372 %100
Eritromisin 15µg	136 %59.3	35 %15.2	58 %25.3	3 %2	1 %0.6	139 %97.2	139 %37.3	36 %9.6	197 %52.9
Tetrasiklin 30µg	165 %72	22 %9.6	42 %18.3	3 %2	0	140 %97.9	168 %45.1	22 %5.9	182 48.9
Rifampin 5µg	25 %10.9	20 %8.7	184 %80.3	0	0	143 %100	25 %6.7	20 %5.3	327 %87.9
Linezolid 30µg	0	0	229 %100	0	0	143 %100	0	0	372 %100
Enrofloksasin 5µg	20 %8.7	63 %27.5	146 %63.7	2 %1.3	0	141 %98.6	22 %5.9	63 %16.9	287 %77.1
Gentamisin 120µg	53 %23.1	6 %2.6	170 %74.2	0	0	143 %100	53 %14.2	6 %1.6	313 %84.1
Streptomisin 300µg	15 %6.5	4 %1.7	210 %91.7	0	0	143 %100	15 %4.0	4 %1	353 %94.8

R: Resistant (dirençli), I: Intermediate (orta duyarlı), S: Sensitive (duyarlı)

Plazmid profilleri incelenen 50 adet enterokok suşunun 28 (%56) tanesinde plazmid saptanamadı. Plazmid izole edilen enterokok suşunun 22 (%44) adetinde 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb, 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb'lık sekiz farklı büyüklükte plazmid belirlendi ve bunların 9 plazmid paternine ayrıldıkları görüldü. Plazmid paternleri P1.....P9 olarak ifade edildi. İzolatlarda 1 ile 3 arasında değişen plazmid varlığı tespit edildi (Resim 2. 1).



Resim 2.1: Enterokok suşlarının agar jel elektroforezde plazmid profilleri

M: Markır, P1-P2: Tek plazmid bantı, P7: İki Plazmid bantı P8: Üç plazmid bantı P9: Plazmid bantı yok

Plazmid profilleri incelenen 7 adet köy tavuğu enterokok suşunun 6 adetinde plazmid bantı (patern 9, P9) görülmedi. 1 adet *E. gallinarum* suşunda 10.10 kb'lık tek plazmid bantı (Patern 2, P2) olduğu görüldü (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5 Köy tavukları kökenli enterokok suşlarının plazmid ve antibiyotik direnç profilleri

Örneğin alındığı yer	Patern	Plazmid sayısı	Moleküler Ağırlık	Antibiyotik direnç özelliği
1. KöyTavukları, <i>E.gallinarum</i>	P2	1	10.10kb	E
2. Köy Tavukları, <i>E.faecium</i>	P9	yok	-	E
3. Köy Tavukları, <i>E.faecium</i>	P9	yok	-	E
4. Köy Tavukları, <i>E.mundtii</i>	P9	yok	-	ENR
5. Köy Tavukları, <i>E.faecalis</i>	P9	yok	-	ENR
6. Köy Tavukları, <i>E.faecalis</i>	P9	yok	-	T
7. Köy Tavukları, <i>Efaecium</i>	P9	yok	-	T

Kb: Kilobaz, T: tetrasiklin, E: eritromisin, ENR: enrofloksasin, P1:8.06 kb'lık plazmid paterni, P9: plazmid bulunmayan patern

Tek, iki, üç, dört, beş ve altı antibiyotiğe direnç gösteren 43 adet broyler kökenli enterokok suşunun 21 adetinde (%48.8) plazmid bantları görüldü. Enterokok izolatlarında 1-3 arasında değişen sayıda plazmid varlığı belirlendi. Enterokok izolatlarının 8 tanesinde 8.06 kb (patern 1, P1), 2 tanesinde 10.10 kb (P2), 5 tanesinde 12.13 kb (P3), 1 tanesinde 16.21 kb (P4) büyüklüğünde tek plazmid, 1

tanesinde 12.13 kb ve 2.99 kb olmak üzere iki plazmid (P5), 2 tanesinde 12.13 kb ve 5.01 kb'lık iki plazmid (P6), 1 tanesinde 16.21 kb ve 3.99 kb'lık iki plazmid (P7) ve 1 tanesinde 2.06 kb, 10.10 kb ve 16.21 kb'lık üç plazmid (P8) belirlendi. Broyler enterokok suşunun 22 adetinde plazmid bantı (P9) görülmedi (Çizelge 2.6).

Çizelge2.6 Broyler kökenli enterokok suşlarının plazmid ve antibiyotik direnç profilleri

Örneğin alındığı yer	Patern	Plazmid sayısı	Moleküler ağırlık	Antibiyotik direnç özelliği
				Bir ilaca dirençli
1. Broyler, E.faecalis	P6	2	12.13kb-5.01kb	T
2. Broyler, E.faecalis	P2	1	10.10kb	E
3. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	T
4. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	E
				İki ilaca dirençli
5. Broyler, E.faecium	P3	1	12.13kb	ENR, QD
6. Broyler, E.faecalis	P1	1	8.06kb	T, QD
7. Broyler, E.faecium	P1	1	8.06kb	E, T
8. Broyler, E.faecium	P1	1	8.06kb	T, ENR
9. Broyler, E.faecalis	P2	1	10.10kb	T, QD
				Üç ilaca dirençli
10. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	P, E, ENR
11. Broyler, E.faecalis	P3	1	12.13kb	E, T, QD
12. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	E, T, ENR
13. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	E,T, RA
14. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	P, E, T
15. Broyler, E.faecium	P3	1	12.13kb	T, RA, QD
16. Broyler, E.faecium	P3	1	12.13kb	E,T, S
17. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	T, CN, S
18. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	T, ENR, CN
19. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	E, T, CN
20. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	E, QD, CN
21. Broyler, E.faecium	P6	2	12,13kb- 5.01kb	T,QD, S
				Dört ilaca dirençli
22. Broyler, E.faecium	P1	1	8.06kb	P, E, T, QD
23. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	P, E, , RA, CN
24. Broyler, E.gallinarum	P5	2	12.13kb- 2.99kb	P, E, T, CN
25. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	E, T, RA, ENR
26. Broyler, E.faecalis	P9	yok	-	E, T, QD, CN
27. Broyler, E.faecalis	P7	2	16.21kb- 3.99kb	E, T, QD, S
28. Broyler, E.faecalis	P1	1	8.06kb	E, T, CN, S
29. Broyler, E.faecalis	P9	yok	-	E, T, QD, S
30. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	E, T, RA, QD
				Beş ilaca dirençli
31. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	E, T, RA, QD, CN
32. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	P, E, T, RA, CN
33. Broyler, E.gallinarum	P1	1	8.06kb	E, T, RA, QD, CN
34. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	E, T, QD, ENR, CN
35. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	E, T, RA QD, ENR
36. Broyler, E.faecalis	P4	1	16.21kb	E, T, QD, RA, S
37. Broyler, E.faecium	P8	3	2.06kb-10.10kb-16.21kb	E, T, QD, CN, S
				Altı ilaca dirençli
38. Broyler, E.gallinarum	P3	1	12.13kb	P, E, T, RA, QD, CN
39. Broyler, E.gallinarum	P9	yok	-	P, E, T, QD, ENR, CN
40. Broyler, E.faecium	P9	yok	-	P, E, T, VA, S, CN
41. Broyler, E.gallinarum	P1	1	8.06kb	E, T, RA, ENR, CN, S
42. Broyler, Efaecium	P9	yok	-	E, T, RA, QD, ENR, S
43. Broyler, E.gallinarum	P1	1	8.06 kb	E, T, RA, QD, CN, S

Kb: Kilobaz, T: tetrasiklin, E: eritromisin, ENR: enrofloksasin, Q/D: kinopristin/dalfopristin, RA: rifampin, CN: gentamisin, S. streptomisin VA: vankomisin

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enterokok'lar antibiyotiklere direnç gösterme özelliği ve genetik madde aktarım kapasitesi yüksek olan mikroorganizmalardandır. Enterokok'lar insan ve hayvanlar için önemli bir patojen bakteri olmamasına rağmen son yıllarda nosokomiyal patojenler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda enterokoklar ve diğer bakteriler arasında direnç determinantlarının genetik yollardan transferinin kanıtlanmış olması ve enterokokların çoklu antibiyotik direnç göstermesi bu konuya olan ilgiyi artırmıştır.

Bu çalışmada Kırıkkale ve Ankara' da bulunan entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerindeki hayvanların intestinal florasındaki *Enterococcus* türlerinin varlığı, yaygınlığı, biotipleri ve izole edilen suşların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik özellikleri ile plazmid profilleri araştırıldı.

Devriese ve ark. (1991) Belçika'da yaptıkları çalışmada bir günlük civcivlerin intestinal florasında *E.faecium* ve *E. faecalis*'i predominant (aynı oranlarda, %41) tür olarak tespit ettiler. 3-4 haftalık tavukların intestinal florasında ise (%46) *E.faecium*'u dominant tür olarak, aynı zamanda *E.faecalis*, *E.hirae*, *E.durans*, *E.cecorum*, *E.gallinarum*, *E. casseliflavus* türleride tanımladılar. 12 haftalıktan büyük tavukların intestinal florasında predominant olarak (%50) *E.cecorum* türü tespit edildi. Bu çalışmada ise broyler gaita örnekleri 4-5 haftalık iken toplanmış olup *E.faecium* predominant tür olarak bulundu ve bunu diğer türler takip etti. Bu sonuçlar enterokokkal floradaki türlerin tavukların belirli yaş dönemlerinde değişimini ortaya koymaktadır. Öte yandan bu çalışmadaki köy tavukları dışkı örneği 12 haftalıktan büyük tavuklardan toplanmasına karşın predominant tür olarak *E.faecium* bulundu. *E.cecorum* türü bulunamadı. Bunun nedeni *E.cecorum*'un izolasyonunun zor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durumu Devriese ve ark. (1991), grup D antijeninden yoksun olan *E.cecorum*'un, %0.3 sodyum azid içeren besiyerlerinde üreyemedikleri ve CO₂ zenginleştirilmiş ortamlarda üreyebildikleri şeklinde açıklamışlardır. Çalışmamızda ise izolasyonda kullanılan besi yeri %0.4 sodyum azid içermekteydi ve CO₂ ile zenginleştirilmiş ortam kullanılmadı.

Yoshimura ve ark. (1998) Japonya'da broyler gaitalarından %44.8 *E.faecium*, %22.8 *E.faecalis*, %12.9 *E.hirae*, %6.7 *E.durans*, %1.1 *E.casseliflavus*, %0.5 *E.gallinarum* türlerinin identifiye edildiğini bildirdiler. Quednau ve ark. (1998) tarafından Danimarka ve İsveç tavukları dışkılarından %54 ve %77 oranında *E.faecium*, %18-%20 oranlarında *E.faecalis*, %9-%5 *E.gallinarum*, %2-%2 *E.hirae*, %4-%0 *E.malodoratus*, %5-%0 *E.pseudoavium*, %0-%1 *E.raffinosis*, %0-%1 *E.avium*, %0-%1 *E.dispar* türlerinin identifiye edildiği bildirildi. Bostwana'da tavuk örneğinden %46.9 *E.faecalis*, %32.9 *E.faecium*, %7.9 *E.casseliflavus*, %7 *E.gallinarum* ve %5.3 *E.avium* türleri identifiye edildi. (Chingwaru ve ark. 2003). Marylan'daki doğu sahil kıyılarındaki tavuk çiftliğinden izole edilen enterokok suşlarından %53.4 *E.faecalis*, %31.4 *E.faecium*, %6.0 *E.gallinarum*, %3.9 *E.hirae*, %1.5 *E.durans*, %1.2 *E.casseliflavus* ve %0.3 *E.avium* türleri saptandı (Hayes ve ark. 2004).

Bu çalışmadaki broyler dışkılarından %42.35 *E.faecium* %34.93 *E.gallinarum*, %18.34 *E.faecalis*, %2.18 *E.casseliflavus*, %0.87 *E.raffinosis*, %0.43 *E.durans*, %0.43 *E.solitarius* ve %0.43 *E.mundtii* türleri identifiye edildi. Yukarıda belirtilen çalışmalarda ve bu çalışmada enterokok tür dağılımının farklı oranlarda olduğu görülmektedir. Bu farklılık, çalışmaların değişik coğrafik bölgelerde yapılmasından ve izolasyon metotlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Tejedor-Junco ve ark. (2005) İspanya'da yaptıkları çalışmada tavuk dışkılarından *E.faecalis* (%63.6), *E.mundtii* (%12.7), *E.faecium* (%9.1), *E.casseliflavus* (%7.3), *E.durans* (%3.7) ve *E.hirae* (%3.6) türlerini identifiye ettiklerini, fakat tavuk orjinli olmasına rağmen *E.gallinarum* ve *E.avium* türlerini identifiye edemediklerini bildirdiler. Bunun sebebini izolasyon aşamasında bütün kolonilerin birbirine çok benzemesinden dolayı bazı türlerin varlığının gözden kaçabileceği şeklinde açıklamışlardır. Bu çalışmada da %34.93 *E.gallinarum* türü identifiye edilmesine karşın *E.avium* türü identifiye edilemedi.

Bu çalışmada köy tavukları gaita örneklerinden %73.42 *E.faecium*, %10.48 *E.mundtii* %9.09 *E.faecalis*, %2.09 *E.gallinarum*, %2.09 *E.durans*, %1.39

E.raffinosisus, %0.69 *E.casseliflavus* ve %0.69 *E. hiraе* türleri saptandı. Köy tavuklarında *E.mundtii* türü %10.48, broylerde ise %0.43 oranında bulundu. Köy tavuklarında *E.mundtii* türünün yüksek çıkması, bu türün bitki ve toprak orjinli olmasından ve köy tavuklarının doğal bitkilerle beslenmesinden kaynaklanabilir.

Yukarıda açıklanan farklı çalışmalarda tavukların enterokokkal florasının coğrafik bölgelere, yaşlara ve izolasyon metotlarının farklılıklarına göre sıklıklarının değişebilmesine karşın belirli türleri içerdiğini göstermektedir. Bu çalışmada identifiye edilen enterokok türlerinin dağılımı insanlarda hastalıklara neden olan türlere benzerlikleri bakımından önem taşımaktadır. İnsanlarda enterokok infeksiyonlarını %85-89'nu *E.faecalis*, %10-15'ni *E.faecium*, %5'ten az oranda *E.gallinarum*, *E. durans*, *E.casseliflavus*, *E.avium* ve *E.raffinosisus* türleri oluşturmaktadır (Koneman ve ark. 1997).

Tıp ve Veteriner hekimlik alanında antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu oluşan antimikrobiyal direnç dünya çapında önemli bir problem haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnç oranındaki artışlar, sadece patojenik bakterilerde değil aynı zamanda kommensal bakterilerde de görülmektedir. Bu kommensal bakteriler patojenik bakteriler için önemli bir direnç gen rezervuarlarıdır (Lukasova ve Sustackova 2003).

Modern ticari broyler işletmelerinde antibiyotikler sadece bakteriyel hastalıkların önlenmesi ve tedavi amaçlı değil aynı zamanda büyütme faktörü olarak da yaygın bir şekilde kullanılmakta ve bu şekildeki yaygın antibiyotik kullanımı sadece dirençli patojenik bakterilerin seleksiyonuna değil aynı zamanda hayvanların bağırsak florasını da etkilemektedir (Van Den Bogaard ve ark. 2002). Enterokok'ların Tıp ve Veteriner hekimlikte kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Lukasova ve Sustackova 2003). Enterokok'lar sahip oldukları antibiyotik direnç genlerini diğer enterokok türlerine veya diğer bakterilere aktarabilme özelliklerine sahiptir. Çoklu antibiyotik dirençli ve vankomisin dirençli enterokoklar yaygın bir şekilde insanlardan, lağım sularından, hayvanlardan ve hayvansal gıdalardan izole edilmiştir (Rice ve ark. 1995).

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

Kaya ve ark. (2007), tavuk intestinal sisteminden izole ettikleri enterokok suşlarının streptomisine %65, tetrasikline %55, eritromisine %45, klindamisine %39, yüksek düzey aminoglikozide %17.5, kloramfenikole %9, siprofloksasine %9 ve penisiline %1.2 oranında dirençli olduklarını tespit ettiler. Çelik (2001), yaptığı çalışmada enterokok suşlarının (tavuk - köpek orjinli) streptomisine %73, ampisiline %53.8, gentamisine %34.6, tetrasikline %30.7, eritromisine %7.6 oranında dirençli olduğunu buldu. Bu çalışmada ise ticari broyler çiftliklerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline %72, eritromisine %59.3, yüksek düzey streptomisin ve gentamisine %6.5 ve %23.1, enrofloksasine %8.7, penisiline %5.6 oranında dirençli oldukları tespit edildi.

Türkiye’de tavuklarda tedavi amaçla kullanılmak üzere makrolidler 1967, tetrasiklinler 1970, betalaktamlar 1973, aminoglikozidler 1991, kinolonlar 1996 yılında ruhsatlandırıldı (Kkgm 2005). Bu çalışmada ve yukarıda belirtilen çalışmalarda elde edilen verilere göre tüm enterokok suşlarının en fazla direnç gösterdiği antibiyotikler sırasıyla tetrasiklin, eritromisin, streptomisin, gentamisin ve ampisilindir. Enterokok’lar penisilin, siprofloksasin ve enrofloksasin antibiyotiklerine karşı daha az oranda direnç göstermiştir. Tetrasiklin, makrolid, aminoglikozid ve betalaktam grubu antibiyotiklerin geniş spektrumlu olması, büyümeyi hızlandırma (tiylosin, oksitetrasiklin) veya tedavi amaçlı uzun yıllar kullanılması sonucu antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmuştur. Enterokok suşlarının aynı antibiyotiklere karşı direnç oranlarının çiftliklere göre farklılık göstermesi bu antibiyotiklerin yoğun veya az kullanımından kaynaklanmaktadır.

Yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç gelişiminin de doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir.

Ticari broyler işletmelerindeki antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç gelişimindeki artış diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir. Güney Amerika ülkelerinden Şili'deki ticari tavuk işletmelerindeki dışkılarından izole edilen enterokokların tetrasikline %81.2, eritromisine %64.5, streptomisine %22.9, penisiline %17.7 ve gentamisine %5.2 oranında dirençli olduğu bulunmuştur (Martin ve ark. 2005). Martin ve ark. (2005), enterokoklardaki tetrasiklin ve eritromisin direncinin yüksek çıkmasını ülkelerinde bu antibiyotiklerin son on yıldır tavuk çiftliklerinde tedavi ve büyütme amaçlı yoğun bir şekilde kullanımından kaynaklanabileceğini rapor ettiler. Poeta ve ark. (2006) Portekiz'de 2004 yılında topladıkları tavuk dışkı örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasikline %97, eritromisine %87.5, siprofloksasine %12.5, ampisiline %10.5, streptomisine %2 ve gentamisine %1 oranında dirençli olduğunu saptadılar. Kolar ve ark. (2002) Çek Cumhuriyeti'nde yaptıkları çalışmada tavuk enterokok izolatlarının tetrasikline %80, eritromisine %59, yüksek düzey streptomisine %22 ve yüksek düzey gentamisine %7 oranında dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ticari broyler işletmelerinden izole edilen enterokok suşlarının tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı direnç oranlarının diğer ülkelere göre düşük olduğu, gentamisin antibiyotiğine karşı ise direnç oranının yüksek olduğu belirlendi.

Ticari broyler işletmelerindeki enterokokların antibiyotik direnç dağılım oranlarının ülkelere göre farklılık göstermesi antibiyotik kullanım politikalarının ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada köy tavuklarından elde edilen enterokok suşlarının, tetrasikline %2, eritromisine %2, enrofloksasine %1.39 oranında dirençli oldukları saptandı. Köy tavukları suşları %4.8 oranında kinopristin/dalfopristine direnç gösterdi. Bu direnç, *E.faecalis*'in kinopristin/dalfopristine intrinsik dirençli olması nedeniyle görüldü. Diğer enterokok suşlarının duyarlı olduğu belirlendi. Köy tavukları dışkı örnekleri antibiyotik kullanılmayan 10-50 adet arasında tavuk içeren kümeslerden toplandı.

Köy tavukları yem katkı maddeleri içermeyen doğal besinlerle (buğday, arpa vb.) beslenmektedir. Bu çalışmada köy tavuklarında antibiyotik direnç oranlarının düşük düzeylerde olmasının nedeni dirençli suşların bakıcılarından ve diğer hayvanlardan bulaştığı düşünülmektedir.

Antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesinden sonraki 1950'li yıllarda çiftlik hayvanlarında, özellikle, tavuklarda büyümeyi hızlandırmak amacıyla yem katkı maddesi olarak kullanılmaya başlandı. Amerika ve Avrupa' da antibiyotiklerin büyük çoğunluğu hayvanlarda büyütme faktörü olarak kullanılmıştır. Geçmişten bugüne kadar basitrasın, tylosin, monensin, salinomisin, spiramisin, tetrasiklin, virjinamisin, avilamisin, avoparsin, efrotomisin, olakuindoks ve karbodoks büyütme faktörü olarak kullanılmış antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklerin hayvan yemlerinde büyütme faktörü olarak subterapotik dozlarda yaygın kullanımı dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden oldu. Bakterilerin antibiyotiklere karşı değişik mekanizmalarla direnç geliştirmeleri ve bu direnç genlerini başka bakterilere aktarabilmeleri sonucu dirençli suşların ortaya çıkması yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Hayvanlarda kullanılan bu antibiyotikler (avoparsin- vankomisin, virjinamisin-kinopristin/dalfopristin) insanlarda kullanılan antibiyotiklerle benzerlik göstermektedir (Wegener ve ark. 1999, Başustaoğlu 2004, Shuford ve Patel 2005).

Danimarka'da avoparsinin kullanımı sonucu aynı gruptan olan vankomisin ve teikoplanine karşı çapraz direnç oluşturması, VRE'lerin saptanması, direncin transfer edilmesi, VRE'lerin seleksiyonuna neden olması ve bu dirençli suşların gıdalar ile insanlara aktarılması gibi nedenlere dayanılarak hayvanlarda avoparsin kullanımı 1995 yılında yasaklanmıştır (Emborg ve ark. 2003). Hayvanlarda büyütme amaçlı kullanılan antibiyotiklerin insan hekimliğinde kullanılan aynı grup antibiyotiklere karşı çapraz direnç oluşturması sonucu insan hekimliğinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğini korumak ve direnç gelişiminin önüne geçmek amacıyla Avrupa Birliği 1999 yılından itibaren avoparsine ek olarak, virjinamisin, basitrasın, tylosin, spiramisin ve avilamisinin büyütme faktörü olarak kullanımını yasaklamıştır. AB'de ki uygulamalara paralel olarak Ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 09.07.1999 tarih ve 14428 sayılı yazısı ile 30.06.1999 tarihinden itibaren söz konusu

antibiyotiklerden avoparsin, spiramisin, virjinamisin, tiylosin fosfat, karbadoks, olakuintoks ve çinko basitrasinin yem katkı maddesi olarak kullanımını yasakladı (Butaye ve ark. 2003, Wegener 2003).

Danimarka'da Heuer ve ark. (2002), avparsininin yasaklanmasından 5 yıl sonra broyler ve kümeslerindeki çevresel örneklerden %74.5 oranında VRE'lar tespit etmiştir. Danimarka'da 1998 yılında yapılan çalışmada VRE direnç oranının %5'ten az oranda olduğu bildirilmiştir (Aarestrup ve ark. 2001). Brezilya'da Sao Paulo'da 10 yıldır avoparsin kullanılan broyler çiftliğinden toplanan dışkı örneklerinden VRE'lar saptanmamıştır (Leme ve ark. 2000). Buna karşın Brezilya'dan Japonya'ya ihracat edilen tavuklarda VRE'lar tespit edilmiştir (Ike ve ark. 1999). VRE oranlarının farklılık göstermesi izolasyon metotlarının farklılığından kaynaklanmaktadır. İzolasyon aşamasında ön zenginleştirme ve vankomisin içeren selektif besi yeri kullanılan çalışmalarda VRE oranı yüksek çıkmıştır.

Bu çalışmada ise bir adet vankomisin dirençli enterokok suşu saptandı. VRE oranının düşük olması izolasyon aşamasında broyler dışkılarında ön zenginleştirme ve vankomisinli selektif agar kullanılmamasından kaynaklandığı görülmektedir.

Yeni Zellanda'da avoparsin yem katkı maddesi olarak 1977-2000 yılları arasında kullanılmıştır. Manson ve ark. (2004) Yeni Zellanda'da avoparsinin yasaklanmasından iki yıl sonra broyler dışkılarındaki VRE oranının %50'den %5.8'e düştüğünü bildirdiler. Tayvan'da Lauderdale ve ark. (2007), avoparsinin yasaklanmasından sonraki 2000-2003 yılları arasında yaptıkları çalışmada broylerden izole edilen *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarındaki vankomisin direnci %13.4 'ten %3.7 ve %3'ten %0 oranına düştüğünü tespit ettiler.

Çelik (2001), tarafından Ankara'da yapılan bir çalışmada tavuk enterokok suşlarının vankomisin direnci %13.6 oranında saptanmıştır. Vankomisin dirençliliği saptanan tavuk suşları avoparsin kullanılan bir işletmeye ait tavuk dışkılarında bulunmuştur. Kaya ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada tavuklarda vankomisin ve teikoplanin dirençli enterokok suşu bulunmadığını bildirdiler.

Bu çalışmada da broyler vankomisin direnci %0.4 oranında belirlendi. Ülkemizde ve diğer ülkelerde avoparsinin büyütme faktörü olarak kullanımının yansaklanmasından sonra zamanla enterokoklarda vankomisin direncinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir.

Avrupa ülkelerinde ve ülkemizde virjinamisin büyütme faktörü olarak kullanılmış bir antibiyotiktir. Kinopristin/dalfopristin virjinamisin gibi iki pristinamisin komponentinden oluşmaktadır. Danimarka'da 1995-1997 yılına kadar virjinamisin broyler çiftliklerindeki kullanımı artmasına takiben broylerdeki virjinamisin dirençli *E.faecium* oranı 1995 yılında %27.3 iken 1997 yılında %66.2 oranına çıkmıştır. 1999 yılında virjinamisin kullanımının yasaklanmasından sonraki 2000 yılında virjinamisin direnç oranı %33,9 düzeylerine düştüğü tespit edildi (Aarestrup ve ark. 2001). Avrupa ülkelerindeki yasaklamalara rağmen İngiltere'de 2002-2003 yılları arasında yapılan bir çalışmada broylerde vankomisin dirençli *E.faecium* suşlarının kinopristin/dalfopristine direnç oranı %50 olarak saptandı (Migura ve ark. 2005). Poeta ve ark. (2006), Portekiz'de 2004 yılında tavuk dışkılarından topladıkları *E.faecium* izolatlarında %33 oranında kinopristin/dalfopristin direnci olduğunu bildirdiler.

ABD'de Hersberger ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada virjinamisin kullanılan tavuk çiftliklerinden izole ettikleri *E.faecium* suşlarında kinopristin/dalfopristin direncinin %85, antibiyotik kullanılmayan çiftliklerden izole edilen *E.faecium* suşlarında kinopristin/dalfopristin direncini %38 (6/16) oranlarında olduğunu tespit ettiler. Hersberger ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada antibiyotik kullanılmayan çiftliklerde düşük oranlarda direnç olmasının nedeninin çiftlikte çalışan insanların dirençli enterokokların çiftlikten çiftliğe yayılmasında potansiyel bir rezervuar rolü oynamasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Van den Bogard ve ark. (2002), dirençli enterokokların hayvanlardan insanlara geçtiğini, insan ve hayvan enterokok suşları arasında direnç gen transferleri olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca dirençli enterokok suşlarının çiftlikte çalışan insanlarda da kolonize olduğunu bildirdiler.

Virjinamisinin kullanıldığı yıllarda kinopristin/dalfopristin direncinin yüksek olduğu yasaklamalardan birkaç yıl sonra direnç oranlarının yarıya düştüğü görülmektedir. Virjinamisinin yem katkı maddesi olarak kullanılmamasına rağmen, hala direnç görülmesi, Heuer ve ark. (2002) tarafından broylerin kesime gönderildiği rotasyonlar arasında, kümeslerin temizlenmesine ve infeksiyonlardan arındırılmasına rağmen, dirençli bakteri klonlarının hala yaşamlarını devam ettirebilmesi nedeniyle kümeslere ard arda gelen broyler sürüleri arasındaki dirençli enterokokların transfer olduğu şeklinde açıklanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre broyler *E.faecium* suşlarının %21.6 (21/97) oranında kinopristin/dalfopristine dirençli, köy tavuklarının ise duyarlı olduğu görüldü. Broyler *E.faecium* suşlarının kinopristin/dalfopristin direnci, Avrupa ülkelerinde yapılan çalışmalara göre düşük oranda bulundu. Bunun nedeni ülkemizde virjinamisin kullanımının Avrupa ülkelerinden daha az oranda kullanılmasına bağlı olabilir.

Joseph ve ark. (2001), tarafından yapılan çalışmada tavuk dışkıları ve çöplüklerinden izole edilen *E.faecalis* suşlarının %97 oranının kinopristin/dalfopristin dirençli, %3 oranının duyarlı olduğu belirlendi. Hayes ve ark. (2004) *E.faecalis* izolatlarının kinopristin/ dalfopristine %96 oranında dirençli, %4 oranında duyarlı olduğunu saptadı. Kizirgil (2007), *E.faecalis* suşlarının kinopristin/dalfopristine %13, 6' nın duyarlı, %39' nun orta duyarlı ve %47.4' nün dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada broyler *E.faecalis* suşlarının kinopristin/dalfopristine %90.4 oranında dirençli, %9.5 oranında orta duyarlı olduğu belirlendi. Bu çalışmadaki *E.faecalis* suşlarının kinopristin/dalfopristin'e direnç oranları diğer yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. *E.faecalis* izolatlarının kinopristin/dalfopristine yüksek oranda direnç göstermesi bu antibiyotiğe karşı intrinsik dirençli olmasından kaynaklanmaktadır. *E.faecalis* izolatlarının kinopristin/dalfopristine intrinsik dirençli olması nedeniyle bazı çalışmalarda değerlendirmeye alınmamasına karşın bu çalışmada ve belirtilen çalışmalarda teyid amacıyla değerlendirmeye alınmıştır.

Plazmid profil analizi DNA'ya dayalı tiplendirme metodlarından biri olup, epidemiyolojik çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Plazmid profil analizi kolay uygulanabilir, tekrarlanabilirliği olan ve ucuz maliyetli bir yöntem olmasına karşın bakterilerin plazmidlerini çabuk kaybedip kazanmalarından dolayı (stabil olmamalarından) aynı bölgeden izole edilen bakteri suşları arasında farklılıklar olmakta ve plazmid içermeyen suşların tiplendirilmesinin yapılamayacağı gibi dezavantajları olan bir yöntemdir (Arbeit 1999).

Malezya'da Son ve ark. (1999), tarafından yapılan çalışmada çoklu antibiyotik direnç gösteren 19 *E.faecium* suşunun 15'inde (%79) plazmid bantları tespit edilirken, 19 adet suşun 4'ünde 36 megadalton ağırlığında tekli plazmid bantları, 11 adetinde 1.5-2.6 megadalton ağırlığında küçük ikili plazmid bantları bulunduğunu ve 4 adet suşta plazmid bantı tespit edilmediği bildirildi. Son ve ark. (1999) plazmid analiz çalışmalarında kullanılan izolat sayısının az olmasından dolayı *E.faecium* suşlarının tiplendirilmesinin yetersiz olduğunu bildirdiler.

Jackson ve ark. (2004), eritromisin dirençli 12 adet enterokok suşlarında 12kb, 14kb ve 16 kb lık tekli plazmid bantları tespit ettiler. Kolar ve ark. (2002), tarafından tavuk orjinli 11 adet vankomisin dirençli enterokok suşlarında 4.3kb-3.2kb-3.0kb-1.6kb'lık dört plazmid, 40>kb- 19kb-5.2kb ve 40> kb - 6.2kb- 5.2kb'lık üç plazmid, 40>kb- 6kb, 6kb -4.1kb, 5.2kb- 4.1kb, 21kb-4.3kb ve 19kb-4.3kb, 'lık iki plazmid bantı içerdiği ve izolatların 9 farklı plazmid paternine ayrıldıkları belirlendi. Çöleri ve ark. (2004), antibiyotik dirençli klinik enterokok izolatlarından sayıları 1-11 arasında olan ve 2.08'ten 56.15kb'a kadar değişen plazmidler buldular. Çoklu antibiyotik dirençli enterokok izolatlarında plazmid görülmesi, antibiyotik direnci ile plazmidler arasında bağlantı olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada da elde edilen verilere göre tekli ve çoklu antibiyotik dirençli 50 adet enterokok suşunun 22 (%44) adetinde 2.06 kb, 2.97 kb, 3.99 kb, 5.01 kb, 8.06 kb, 10.10 kb, 12.13 kb ve 16.21 kb'lık sekiz farklı büyüklükte plazmid belirlendi ve bunların 9 plazmid paternine ayrıldıkları görüldü. Enterokok suşunun 28 (%56) adetinde plazmid saptanamadı. Çoklu antibiyotik dirençli enterokok

izolatlarında plazmid varlığı daha az oranda saptandı. Yukarıda belirtilen çalışmalarda ve bu çalışmada plazmid izolasyon oranlarındaki farklılık enterokoklarda bulunan plazmidlerin stabil olmamasından ve plazmidlerini çabuk kaybedip kazanmalarından dolayı kaynaklandığı düşünülebilir.

Radu ve ark. (2001), tarafından yapılan çalışmada tavuk orjinli kaynaklardan izole edilen 70 adet enterokok suşunun 38 adetinde (%54.2) 1.1- 35.3 MDa arasında değişen plazmid bantları tespit edildi. Radu ve ark. (2001), enterokok suşlarının yarısından azında plazmid bantlarının bulunamamasına karşın bu suşların çoklu antibiyotik direnç oranlarının yüksek olması gen transferlerinde muhtemel rolleri olabileceğini bildirdiler. Bu nedenle plazmid içeren ve içermeyen antibiyotik (vankomsin) dirençli enterokok suşlarının virülens faktörlerini ve antibiyotik direnç özelliklerini etkili gen transfer mekanizmaları ile aktarabilmesi nedeniyle ciddi risk grubu olarak devam edebileceklerini açıkladılar.

Sonuç olarak, bu çalışmada Ankara ve Kırıkkale illerinde bulunan broylerlerin çoklu antibiyotik dirençli enterokok yönünden önemli bir rezervuar olduğu belirlendi. Broylerden izole edilen dirençli enterokok suşlarında farklı büyüklüklerde plazmid profilleri olduğu belirlendi. Enterokok plazmidlerinin antibiyotik direnç genlerini konjugasyon yoluyla insanlar için patojen olan bakterilere transfer etmesi önemli bir risk olarak değerlendirildi.

Bu çalışmadaki *E.faecium* suşlarının kinopristin/dalfopristin direncinin nedeni moleküler çalışmalar yapılarak tespit edilmelidir. Enterokoklar sahip oldukları antibiyotik dirençliliğini kontamine tavuk gıdaları aracılığı ile insanlara aktarabileceği görülmektedir. Broyler işletmelerindeki antibiyotiklere karşı direncin oluşmasını ve bakterilerdeki çoğul dirençliliğin engellenmesi için ülke genelinde çok merkezli epidemiyolojik çalışmalar yapılarak patojen ve kommensal bakterilerdeki antibiyotik direnç durumunun ve gelişen direncin moleküler kökeninin sürekli takip edilmesi gerekli görülmektedir. Elde edilen sonuçlar Veteriner ve Tıp hekimliği ile paralel olarak değerlendirilmeli ve ulusal antimikrobiyal kullanım stratejileri geliştirilmelidir.

KAYNAKLAR

AARESTRUP FM, SEYFARTH AM, EMBORG HD, PEDERSEN K, HENDRIKSEN RS, BAGER F (2001). Effect of Abolishment of the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion on Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fecal Enterococci from Food Animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:2054-20059.

ARBEIT RD (1999). Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganism. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. MURRAY PR., BARON EJ., PFALLER MA., TENOVER FC., and YOLKEN RH. 7rd ed, ASM press, Washintong, U.S.A. p: 116-137.

ARTHUR M, COURVALIN P (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 1563–1571.

ARTHUR M, MOLINAS C, DEPARDIEU F, REYNOLDS P, COURVALIN P (1993). Characterization of Tn1546, a Tn3-Related Transposon Conferring Glycopeptide Resistance by Synthesis of Depsipeptide Peptidoglycan Precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.*, 175: 117-127.

ARTHUR M, DEPARDIEU F, REYNOLDS P, COURVALIN P (1995). The van Z gene of Tn 1546 from *Enterococcus* BM4147 Confers Resistance to Teicoplanin Gene. *Mol. Microbiol.*, 154: 87- 92.

BAGER F, MADSEN M, CHRISTENSEN J, AARESTRUP FM (1997). Avoparcin Used as a Growth Promoter is Associated with the occurrence of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and Pig Farms. *Prevent. Vet. Med.*, 31: 95- 112.

BAPTISTA M, DEPARDIEU F, COURVALIN P, ARTHUR M (1996). Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 2291-2295.

BAŞUSTAOĞLU A (2004). Hayvan Yemlerinde Büyütme Faktörü Olarak Kullanılan Antibiyotiklerin Direnç Gelişimindeki Rolü. *Hastane İnfek. Derg.*, 8: 286- 291.

BAŞUSTAOĞLU A, ÖZYURT M, BEYAN C (2000). Kan kültürlerinden izole edilen glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium*. *Flora*, 5(2):142-147.

BERSOS Z, MANIATI M, KONTOS F, PETINAKI E, MANIATIS AN (2004). First Report of a Linezolid Resistant Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* strain in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.*, 685- 686.

BERZEG D (2005). Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ve E test ile Vankomisin Mik Değerlerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi.

BHAKDI S, KLONISCH T, NUBER P, FISCHER W (1991). Stimulation of Monokine Production by Lipoteichoic Acids. *Infect. Immun.*, 59: 4614- 4620.

BİLGEHAN H (2002). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 3. Baskı. İzmir, s: 495- 523.

BROWN MB, ROBERTS MC (1991). Tetracycline Resistance Determinants in Streptococcal species Isolated from the Bovine Mammary Gland. *Vet. Microbiol.*, 29:173-180.

BUGG T D H, DUTKA-MALEN S, ARTHUR M, COURVALIN P, WALSH C T (1991). Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine-D-alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry*, 30: 2017–2021.

- BUTAYE P, DEVRIESE A, HAESEBROUCK F (2003). Antimicrobial Growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2:175-188.
- CASADEWALL B, COURVALIN P (1999). Characterization of the *vanD* Glycopeptide Resistance Gene Cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.*, 181: 3644- 3648.
- CHAVERS LS, MOSER SA, BENJAMIN WH, BANKS SE, STEINHAUER JR, SMITH AM, JOHNSON CN, FUNKHOUSER E, CHAVERS LP, STAMM AM, WAITES KB (2002). Vancomycin- Resistant Enterococci. 15 years and counting. *J.Hosp. Infect.*, 53: 159- 171.
- CHINGWARU W, MPUCHANE SF, GASHE BA (2003). Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated from Milk, Beef, and Chickens and their Antibiotic Resistance. *J. Food Protect.*, 66: 931-936.
- CHOPRA I, ROBERTS M (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65: 232- 260.
- CLANCY J, PETITPAS JW, DIB-HAJJ F, YUAN W, CRONAN M, KAMATH A, BERGERON J, RETSEMA J (1996). Molecular Cloning and Functional Analysis of Novel Macrolide Resistance Determinant *mefA* from Streptococcus pyogenes. *Mol. Microbiol.*, 22: 867- 879.
- CLARK NC, TEIXERIA LM, FACKLAM RR, TENOVER FC (1998). Detection and Differentiation of *vanC1*, *vanC2*, and *vanC3* Glycopeptide Resistance Genes in Enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2294- 2297.
- CLEWELL DB (1990). Movable Genetic Elements and Antibiotic Resistance in Enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 90- 102.
- CLINICAL LABORATORY STANDARTS INSTITUTE (2003). M7-A6 aerop Üreyen Bakteriler için Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri.6. Baskı ve M2-A8 Antimikrobik Disk Diffüzyon Testleri İçin Uygulama Standartları. 8. Baskı: 3(1) ve 3(2),
- COQUE T.M, PATTERSON ME, STECKELBERG JM, MURRAY BE (1995). Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.*, 171: 1223- 1129.
- ÇELİK S (2001). Hayvan Kökenli Enterokok Suşlarının Virülens Faktörleri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ÇETİNKAYA Y, FALK P, MAYHALL CG (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13(4): 686- 707.
- ÇINAR T, LEBLEBİCİOĞLU H. SÜNBÜL M, EROĞLU C, ESEN Ş, GÜNAYDIN M (1999). Enterokoklarda Yüksek Düzey Gentamisin ve Streptomisin Direncinin Araştırılması. *Flora*, 4: 114- 119.
- ÇÖLERİ A.ÇOKMUŞ C, ÖZCAN B, AKÇELİK M, TUKEL Ç (2004). Determination of Antibiotic Resistance and Resistance Plasmid of Clinical Enterococcus Species, *J.Gen. Appl. Microbiol*, 50: 213- 219.
- DAHL K H, SIMONSEN G S, OLSVIK Ø, SUNDSFJORD A (1999). Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1105-1110.

- DARGERER S, VERGNAUD M, VERDON R, SALOUX E, PAGE O, LECLERCQ R, BAZIN C (2002). Enterococcus gallinarum Endocarditis Occuring on Native Heart Valves. *J.Clin. Microbiol.*, 40: 2308- 2310.
- DECLERCQ R, NANTAS L, SUOSSY C, DUVAL J (1992). Activitiy of RP59500 a new Parenteral Semisynthetic Streptogramin against Staphylococcus with Various Mechanism of Resistance to Macrolide –Lincosamide Streptogramin Antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.*, 30: 60- 67.
- DELISLE S, PERL TM (2003). Vancomycin-Resistant Enterococci A Road Map on How To Prevent the Emergence and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Chest*, 123: 504S- 518S.
- DEPARDIEU F, BONORAMG, REYNOLDS P, COURVALIN P (2003). The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol. Microbiol.*, 50: 931.
- DEVRIESE LA, UYTTEBROEK E, DUCATELLE R, VIAENE N, DERIJCKE J, GEVAERT D (1990). Tracheitis due to Enterococcus faecalis in Canaries. *J. Assoc. Avian Vet.*, 4: 113- 116.
- DEVRIESE LA, HOMMEZ J, WIJFELS R, HAESEBROUCK F (1991) Composition of the Enterococcal and Streptococcal Intestinal Flora Poultry. *J. Appl. Bacteriol.*, 71: 46-50.
- DINA J, MALBRUNY B, LECLERCQ R (2003). Nonsense Mutations in the *lsa*-Like Gene in *Enterococcus faecalis* Isolates Susceptible to Lincosamides and Streptogramins A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(7): 2307–2309.
- DONABEDIAN SM, CHOW JW, BOYCE JM, MCCABE RE, MARKOWITZ SM, COUDRON SE, KURITZA A, PIERSON CL, ZERVOSI MJ (1992). Molecular Typing of Ampicillin-Resistant, Non- β -Lactamase-Producing Enterococcus faecium Isolates from Diverse Geographic Areas. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 2757- 2761.
- DUNNY GM, LEONARD BA, HEDBERG PJ (1995). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. interbacterial and host-parasite chemical communication. *J. Bacteriol.*, 177: 871–876.
- DUPONT H, MONTRAVERS P, MOHLER J, CARBON C (1998). Disparate Findings on the Role of Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* in Mouse and Rat Models of Peritonitis. *Infect. Immun.*, 66(6): 2570- 2575.
- EHRENFELD EE, KESSLER RE, CLEWELL DB (1986). Identification of Pheromone induced Surface Proteins in *S.faecalis* and Evidence of a Role for Lipoteichoic Acid in Formation of Mating Aggregates. *J. Bacteriol.*, 168: 6- 12.
- ELSINGHORST TH. AM (2003). First Cases of Animal Diseases Published since 2000. *2.Cats. Vet. Quarterly.*, 25(4): 124- 130.
- EMBORG HD, ANDERSEN HJ, SEYFART AM, WEGENER HC(2003). Relations between the Consumptions of Antimicrobial Growth Promoters and the Occurence of Resistance among Enterococcus faecium Isolated from Broiler. *Epidemiol. Infect.*, 132: 95- 105.
- ERSOY Y, SÖNMEZ E, YOUNG J, AĞEL E, DURMAZ B (2001). Malatya Kayseri ve Eleziğ Tıp Fakültesi Hastanelerinde İzole Edilen Enterokok Suşlarında Glikopeptid Direncin Araştırılması. *Mikrobiyol. Bült.*, 35:197-209.
- FACKLAM RR (1972). Recognition of Group D Streptococcal Species of Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. *Appl. Microbiol.*, 23: 1131- 1139.
- FACKLAM RR, COLLINS MD (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 731-734.

- HEUER OE, PEDERSEN K, JENSEN LB, MADSEN M, OLSENJE (2002). Persistence of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in Broiler Houses after the Avoparcin Ban. *Microbiol. Drug. Res.*, 8(4): 355-361.
- HIRSH DC, MACLACHLAN NJ, WALKER RL (2004). Streptococcus and Enterococcus. *Veterinary Microbiology*. 2.Ed, 28: 159- 169.
- HORINOUCI S, BYEON WH, WEISBLUM B (1983). A Complex Attenuator Regulates Inducible Resistance to Macrolides, Lincosamides, Streptogramin type B Antibiotics Streptococcus sanguis. *J.Bacteriol.*, 154: 1252- 1262.
- HOŞGÖR M, ÇAVUŞOĞLU C, TÜNGER A, ÖZİNEL MA (1997). Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci. *İnfek. Derg.*, 11:7-9.
- HUYS G, D'HAENE K, COLLARD JM, SWINGS J (2004). Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in Enterococcus Isolates from Food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 1555- 1562.
- IKE Y, CLEWELL DB (1992). Evidence that the Hemolysin /Bacreriocin phenotype of Enterococcus faecalis subs. zymogenes can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J. Bacteriol.*, 174: 8172- 8177.
- IKE Y, TANIMOTO K, OZAWA Y, NOMURA T, FUJIMOTO S, TOMITA H (1999). Vancomycin resistant enterococci in imported Chickens In Japan. *Lancet*, 353: 1854.
- JACKSON CR, CRAY P, BARET J, LADELY S (2004). Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis.*, 48(1): 100-107.
- JETT BD, HUYCKE MM, GILMORE MS (1994). Virulence of Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7: 468- 478.
- JONES CS, OSBORNE DJ, STANLEY J (1992). Enterobacterial. Tetracycline Resistance in Relation to Plasmid Incompatibility. *Mol. Cell. Probes.*, 6: 313- 317.
- JOHNSON AP, WOODFORD N (1998). Plasmid Analysis. *Molecular Bacteriology Protocols and Clinical Applications* Ed. JOHNSON AP. WOODFORD N. Humana press, U.S.A. p: 51- 63.
- JOSEPH SW, HAYES JR, ENGLISH LL, CARR LE, WAGNER DD (2001). Implication of multiple antimicrobial resistant enterococci, associated with the poultry environment. *Food Add. Contamin.*, 12: 1118-1123.
- KAYA S, ÇETİN ES, ARIKAN S, TETİK T, KESBİÇ H, YAŞAR S (2007). Tavuklardan izole edilen *E.coli*, klebsiella ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık durumları. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2007;14(2): 24-27.
- KİZİRGİL A (2007). Kinopristin/ Dalfopristin ve Diğer Sekiz Antimikrobiyal Ajanın Gram Pozitif Koklar Üzerine in Vitro Etkinliği. *F.Ü. Sağ.Bil.Derg.*, 21(3): 129-132.
- KLEIN G (2003) . Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.*, 88:123- 131.
- KOCH S, HUFNAGEL M, THEILACKER C, HUEBNER J (2004). Enterococcal Infections: Host Response, Therapeutic and Prophylactic Possibilities. *Vaccine*, 22: 822- 830.
- KOLAR M, PANTUCEK R, BARDON J, VAGNEROVA J, TYPOVSKA H, VALKA I, DOSKAR J (2002). Occurrence of Antibiotic Resistant Bacterial Strains Isolated in Poultry. *Vet. Med.*, 47: 52-59.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM (1997). "The Gram Positive Cocci, Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria". In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Philadelphia. Lippincott, p: 577- 629.

KORTEN V (2004). Linezolid. *Ankem Derg.*, 18: 178- 180.

KORUMA KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2005). Ruhsatlandırılmış Veteriner İlaçları. Erişim: [http:www.kkgm. gov.tr], Erişim tarihi: 20.12.2005.

LAPOINTE JM, HIGGINS R, BARETTE N, MILETTE S (2000). Enterococcus hirae Enteropathy with Ascending Cholangitis and Pancreatitis in a Kitten. *Vet. Pathol.*, 37: 282- 284.

LAUDERDALE TL, SHIAU YR, WANG HY, LAI JF, HUANG IW, CHEN PC, CHEN HY, LAI SS, LIU YF, HO M (2007). Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan. *Environ. Microbiol.*, 9(3):819-23.

LECLERG R (2002). Mechanism of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 482- 492.

LECLERG R, COURVALIN P (1996). Emerging problems with enterococcal infections. *Cur. Opin. Infect. Dis.*,9: 115- 119.

LEENER ED, MARTEL A, GRAEF E.M, BUTAYE P, TOP J, HAESBROUCK F, WILLEMS R, DECOSTERE A (2005). Molecular Analysis of Human, Porcine and Poultry Enterococcus faecium Isolates and Their erm (B) Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 2766- 2770

LEME IL, PIANTINO AJ, BOTTINO JA, PIGNATARI AC (2000). Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in Sao Paulo, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 31: 53-57.

LESTER C, MOLLER N, HAMMERUM A (2004). Conjugal Transfer of Aminoglycoside and Macrolide Resistance between Enterococcus faecium Isolates in the Intestine of Streptomycin-Treated Mice. *Feems Microbiol. Lett.*, 235: 385- 391.

LINDEN PK, MOELLERING RC, WOOD CA (2001). Treatment of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Infections with Quinupristin/dalfopristin. *Clin. Infect. Dis.*, 33: 1816- 23.

LUKASOVA J, SUSTACKOVA A (2003). Enterococci and Antibiotic Resistance. *Acta Vet. Brno.*, 72: 315- 323.

MANSON JM, SMITH JMB, COOK GM (2004). Persistence of Vancomycin-Resistant Enterococci in New Zealand Broilers after Discontinuation of Avoparcin Use. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:5764- 5768.

MARTIN BS, CAMPOS L, BRAVO V, ADASNE M, BORIE C (2005). Evaluation of Antimicrobial Resistance using Indicator Bacteria Isolated from Pigs and Poultry in Chile. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 3:171- 178.

MENDEZ-ALVAREZ S, PEREZ- HERNANDEZ X, CLAVERIE-MARTIN F (2000). Glycopeptide resistance in enterococci. *Int. Microbiol.*, 3: 71- 80.

MIN Y, JEONG J, CHOI Y, YUN H, LEE K, SHIM M, KWAK J, CHOI E (2003). Heterogeneity of Macrolide- Lincosamide- StreptograminB resistance Phenotypes in Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 3415- 3420.

MIGURA LG, PLEYDELL E, BARNES S, DAVIES RH, LIEBANA E (2005). Characterization of Vancomycin Resistant Enterococcus faecium Isolates from Broiler Poultry and Pig Farms in England and Wales. *J.Clin. Microbiol.*, 43: 3283- 3289.

- MIYAZAKI S, OHNO A, KOBAYASHI I, UJI T, YAMAGUCHI K, GOTO S (1993). Cytotoxic Effect of Hemolytic Culture Supernatant from *E. faecalis* on Mouse polymorfonuclear neutrophils and Macrophages. *Microbiol. Immunol.*, 37: 265- 270.
- MOELLERING RC (1998). Clinical updates in infectious diseases. Erişim Adresi: [<http://nfid.org/publications/clinicalupdates>]. Erişim Tarihi: 13/ 11/ 2006.
- MUNDY LM, SAHM DF, GILMORE M (2000). Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 328-334.
- MURRAY BE (1990). The Life and Times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3: 46- 65
- MURRAY BE (1997). Vancomycin- resistant enterococci. *Am. J. Med.*, 101: 284-293.
- NICHOLS RL, GRAHAM DR, BARRIERE SL (1999). Treatment of Hospitalized Patients with Complicated Gram-positive Skin and Skin Structure Infections: two Randomized, Multicentre Studies of Quinupristin/dalfopristin Versus Cefazolin, Oxacillin or Vancomycin, Synercid Skin and Skin Structure Infection Group. *J. Antimicrob. Chemother.*, 44: 263- 73.
- OLMSTED SB, DUNNY GM, ERLANDSEN SL, WELLS CL (1994). A Plasmid Encoded Surface Protein on *E. faecalis* Augments its Internalization by Cultured Intestinal epithelial Cells. *J. Infect. Dis.*, 170: 1549- 1556.
- OZAWA Y, TANIMOTO K, NOMURA T, YOSHINAGA M, ARAKAWA Y (2002). Vancomycin-Resistant Enterococci in Humans and Imported Chickens in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6457- 6461.
- PATTERSON JE, MASECAR B, ZERVOS M (1998). Characterization and Comparison of Two Penicillinase-Producing Strains of *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32: 122- 124.
- PERICHON B, REYNOLDS P, COURVALIN P (1997). VanD Type Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41: 2016- 2018.
- POETA P, COSTA D, RODRIGUES J, TORRES C (2006). Antimicrobial Resistance and the Mechanism Implicated in Faecal Enterococci from Healthy Humans, Poultry and Pets in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agent.*, 27: 131- 137.
- PORTILLO A, RUIZ-LARREA F, ZARAZAGA M, ALONSO A, MARTINEZ J, TORRES C (2000). Macrolide Resistance Genes *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 967- 971.
- PRYSTOWSKY J, SIDDIQUI F, CHOSAY J, SHINABARGER D, MILLICHAP J, PETERSON L.R, NOSKIN GA (2001). Resistance to Linezolid: characterization of Mutations in rRNA and Comparison of their Occurrence in Vancomycin Resistant Enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 2154- 2156.
- QUEDNAU M, AHRNE S, MOLIN PG (1998). Antibiotic Resistant Strains of *Enterococcus* Isolated from Swedish and Danish Retail Chicken and Pork. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 1163- 1170.
- QUINN PJ, CARTER ME, MACKEY B, CATER GR (2000). The Streptococci and Related Cocci, *Clinical Veterinary Microbiology*, 5 th Ed, Virginia USA, p: 127-136.
- RADU S, TOOSA H, RAHIM RA, REEZAL A, AHMAD M, HAMID AN, RUSUL G, NISHIBUCHI M (2001). Occurrence of the *vanA* and *vanC₂ /vanC₃* genes in *Enterococcus* species isolated from poultry sources in Malaysia. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 39: 145-153.

- RENDE-FOURNIER R, LECLERCQ R, GALIMAND M, DUVAL J, COURVALIN P (1993). Identification of the *sata* gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37:2119–2125.
- REYNOLDS PE, DEPARDIEU F, DUTKA-MELAN S, ARTHUR M, CUORVALIN P (1994). Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.*, 13(6): 1065- 1070.
- RICE EW, MESSER JW, JOHNSON CH, REASONER DJ (1995). Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1 61: 374- 376.
- RICE LB, CARIASL L, RUDIN S, LAKTICOVA V, WOOD A, THOMAS RH (2005). *Enterococcus faecium* Low-Affinity *pbp5* Is a Transferable Determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 5007-5012.
- ROBERTS MC, SUTCLIFFE J, COURVALIN P, JENSEN LB, ROOD J, SEPPALA H (1999). Nomenclature of Macrolide and Macrolide-Lincosamide- Streptogramin B Resistance Determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 2823- 2830.
- RODRIGUES J, POETA P, MARTIN SA, COSTA MD (2002). The importance of Pets as Reservoirs of Resistant *Enterococcus* Strains with Special Reference to Vancomycin. *J. Vet. Med.*, 49: 278- 280.
- RUIZ J (2003). Mechanism of Resistance to Quinolones: Target Alterations, Decreased Accumulation and DNA gyrase Protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51: 1109- 1117.
- SAHM D F, KISSINGER J, GILMORE M S, MURRAY P R, MULDER R, SOLLIDAY J, CLARKE B (1989). In Vitro Susceptibility Studies of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 1588- 1591.
- SCHMITZ FJ, SADURSKI R, KRAY A, BOOS M, GIESEL R, KOHRER K, VERHOEF J, FLUID C (2000). Prevalence of Macrolide- Resistance Genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* Isolates from 24 European University Hospitals. *Int. Antimicrob. Chemother.*, 45: 891- 894.
- SHANKAR V, BAGHDAYAN A, HUYCKE M, LINDAHL G, GILMORE M (1999). Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect. Immun.*, 67: 193- 200.
- SHUFORD JA, PATEL R (2005). Antimicrobial Growth Promoter Use in Live- Implications for human Healt. *Rev. Med. Microbiol.*, 16: 17- 24.
- SIMJEE S, WHITE DG, WAGNER DD, MENG J, QAIYUMI S, ZHAO S, MCDERMOTTPF (2002). Identification of *vat(E)* in *Enterococcus faecalis* Isolates from Retail Poultry and Its Transferability to *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(12): 3823–3828.
- SINGH KV, WEINSTOCK GM, MURRAY BE (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46:1845-1850.
- SOLWAY S, VINCENT L, TIAN N, WOODFORD N, BENDALL R (2003). Isolation of Streptogramin Resistant *Enterococcus faecium* from Human and non-Human Sources in a Rural Community. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52: 707- 710.
- SON R, NIMITA F, RUSUL G, NASRELDIN E, SAMUEL L, NISHIBUCHI M (1999). Isolation and Molecular Characterization of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29: 118- 122.

STOCKSTAD E LR, JUKES TH, PIERCE J, PAGE AG, FRANKLIN AL (1949). The Multiple Nature of the Animal Protein Factor. *J.Biol. Chem.*, 180: 647-654.

SÜMERKAN B (2004). Vankomisin Dirençli Enterokoklar. Erişim Adresi: (simad55.tripod.com/kitap2002/035.pdf). Erişim Tarihi: 18.01.05.

ŞENER K, SARAÇLI MA, AÇIKLEL CH, DOĞANCI L (2004). Nozokomiyal Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus İzolatlarının Genotiplendirilmesinde Üç ayrı Yöntemin İncelenmesi. *Mikrobiyol. Bül.*, 38(4): 363- 375.

THANKSON JD, THAXTON JP, VIZZIER Y (2002). Biochemical and Immunological Changes in Chickens Experiencing Pulmonary Hypertension Syndrome Caused by Enterococcus faecalis. *Poultry Science*, 81: 1826- 1831.

TEJEDOR- JUNCO MT, AFONSO- RODRIQUEZ O, MARTIN- BARRASA JL, GONZALEZ- MARTIN M (2005). Antimicrobial Susceptibility of Enterococcus Strains Isolated from Poultry Faeces. *Res. Vet. Sci.*, 78(1):33-38.

TESTA RT, PETERSEN PJ, JACOBUS NL, SUM PE, LEE VJ, TALLY FP (1993). In vitro and In vivo Antibacterial Activites of the Glycylcyclines a new Class of Semisyntetic Tetracyclines *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 2270- 2277.

THAL LA, ZERVOS MJ (1999). Occurence and Epidemiology of Resistance to Virginamycin and Streptogramin, *J. Antimicrob. Chemother*, 43, 171- 176.

ULUSOY S (2004). Streptograminler (Kinopristin/Dalfopristin). *Ankem Derg.*, 18: 174- 177.

USTAOĞLU R, AK Ö, ÖZER S (2006). Klinik örneklerden izole edilen Enterococcus suşlarında antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 36 (2). 75-78.

VAN DEN BOGAARD AE, JENSEN L, STOBBERINGH E (1997). Vancomycin Resistant Enterococci in Turkeys and Farmers. *N. Engl. J. Med.*, 337:1558- 1559.

VAN DEN BOGAARD AE, STOBBERINGH EE (2000). Epidemiology of Resistance to Antibiotics- links between Animals and Humans. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14: 327- 355.

VAN DEN BOGAARD AE, WILLEMS R, LONDON N, TOP J, STOBBERINGH EE (2002). Antibiotic Resistance of Feecal Enterococci in Poultry, Poultry Farmers and Poultry Slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49: 497- 505.

VURAL T, ŞEKERCİOĞLU AO, ÖĞÜNÇ D, GÜLTEKİN M, ÇOLAK D, YEŞİLİPEK A, ÜNAL S, KOCAGÖZ S, MUTLU G (1999). Vankomisin dirençli Enterococcus faecium suşu. *Ankem Derg.*, 13:1

WEGENER HC, AARESTRUP FM, JENSEN LB, HAMMERUM AM, BAGER F (1999). Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and Enterococcus faecium Resistance to Terapeutic Antimicrobial Drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 5: 329- 335.

WEGENER HC (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.*, 6: 439-445.

WEISBLUM B (1995). Erythromycin Resistance by Ribosome Modification, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39: 577- 585.

WERNER G (1999). Characterization of a New Enterococcal Gene SatG Encoding a Putative Acetyltransferase Conferring resistance to Streptogramin A Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 3455- 3459.

YETKİN MA, ATEŞ AN (2004). Vankomisine dirençli enterokok bakteremisi: Olgu sunumu. *Hastane İnfek. Derg.*, 8 (4):310-314.

YOSHIMURA H, ISHIMARU M, ENDOH YS (1998). Isolation of Glycopeptide-Resistant Enterococci from Chickens in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42: 3333.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel bilgiler

Adı: Zahide

Soyadı: Dilik

Doğum yeri ve tarihi: Selendi/ Manisa, 1978

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: İlçe Tarım Müdürlüğü Kula/ Manisa

Tel:0236 8166099

Eğitim

Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi

Kula Lisesi

Mesleki deneyimi

Suluova İlçe Tarım Müdürlüğü Veteriner Hekim 2006

Kula İlçe Tarım Müdürlüğü Veteriner Hekim 2007

Bilimsel Etkinlikler

A. Projeler

KASIMOĞLU A, İSTANBULLUOĞLU E, ÇAY Z. Broyler İşletmeleri ile Kırsal Tavukçuluk İşletmeleri'ndeki Hayvanlardan İzole Edilen Enterokokların Fenotipik Özellikleri ve Plasmid Profilleri Üzerinde Çalışmalar. K.Ü. BAP 2005/11.

B. Seminerler

Listeria İnfeksiyonları

Sitokinler