

Tavuk ve martı kökenli enterokok türlerinin antibiyotik dirençliliğinin fenotipik ve genotipik analizi*

Ömer AKGÜL¹, Timur GÜLHAN², Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU³

¹Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van; ²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, ³Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Van/Türkiye

Özet: Bu çalışmada, Van ili ve ilçelerinde halk elinde yetiştiriciliği yapılan tavuklardan ve Van Gölü Havzasının değişik noktalarında insanlarla ilişki halinde olan martı popülasyonlarından alınan dışkı örnekleri enterokok türleri açısından incelendi. Bu amaçla 500 tavuk ve 500 martı olmak üzere toplam 1000 adet dışkı örneği toplandı. Tavuk dışkı örneklerinden 192 (%38.4) ve martı dışkı örneklerinden ise 119 (%23.8) olmak üzere toplam 311 (%31.1) adet enterokok izole edildi. Tavuk orijinli izolatların 41 (%21.3)'i *Enterococcus faecalis*, 110 (%57.3)'ü *E. faecium*, 9 (%4.7)'ü *E. casseliflavus/gallinarum*, 27 (%14.1)'si *E. hirae*, 5 (%2.6)'i *E. durans* olarak tanımlandı; martı orijinlilerin 78 (%65.5)'i *E. faecalis*, 21 (%17.6)'i *E. faecium*, 10 (%8.4)'ü *E. hirae*, 7 (%5.9)'si *E. casseliflavus/gallinarum*, 2 (%1.7)'si *E. raffinosus*, 1 (%0.8)'i *E. durans* olarak tanımlandı. Fenotipik analiz, antibiyogram testi (disk difüzyon yöntemi) ile yapıldı. Genotipik olarak ise 16S rRNA, 16S ve 23S arası bölgeler, *esp*, *vanA*, *vanB* ve *vanC* (C-1, C-2, C-3) genleri analiz edildi. Tüm izolatların antibiyotik dirençlilikleri dikkate alındığında, en fazla dirençlilik sefadroksil (%99.5) en az dirençlilik ise imipenem (%0.8) karşı saptandı. İzolatların 9 (%2.9)'ü fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunurken, 20 (%6.4)'ünde genotipik olarak vankomisin dirençlilik geni (*van*) belirlendi. Bunlardan 6 *E. faecalis* (1'i tavuk, 5'i martı orijinli) ve 3 *E. faecium* (martı orijinli) izolatının *vanA*, 6 *E. casseliflavus/gallinarum* izolatının *vanC1* (2'si tavuk, 4'ü martı orijinli) ve 5 *E. casseliflavus/gallinarum* (tavuk orijinli) izolatının ise *vanC2/3* geni taşıdığı tespit edildi. Martı izolatlarında *vanC2/3* genlerine raslanılmazken, tavuk ve martı orijinli tüm izolatlar *vanB* geni açısından negatif bulundu. Sonuç olarak, bu araştırma ile bölgemizde ilk kez vankomisin dirençli enterokok türlerinin varlığı ortaya konuldu.

Anahtar sözcükler: Antibiyogram, enterokok, martı, tavuk, VRE.

Phenotypic and genotypic analysis for antibiotic resistance of *Enterococcus* species with chicken and gull origin

Summary: In this study, faecal samples of backyard chickens in the city of Van and its districts and gulls in contact with humans in Van Lake basin have been obtained and examined for *Enterococcus* species. For this purpose, 1000 faecal samples have been obtained as 500 from chickens and 500 from gulls. In the study, *Enterococcus* has been isolated and identified from a total of 311 (31.1%) faecal samples as 192 (38.4%) from chickens and 119 (23.8%) from gulls. 41 (21.3%) of chicken-origin isolates have been identified as *Enterococcus faecalis*, 110 (57.3%) as *E. faecium*, 9 (4.7%) as *E. casseliflavus/gallinarum*, 27 (14.1%) as *E. hirae*, 5 (2.6%) *E. durans* while 78 (65.5%) of gull-origin isolates have been identified as *E. faecalis*, 21 (17.6%) as *E. faecium*, 10 (8.4%) as *E. hirae*, 7 (5.9%) as *E. casseliflavus/gallinarum*, 2 (1.7%) as *E. raffinosus* and 1 (0.8%) as *E. durans*. Phenotypically antibiotic susceptibility testing (disc diffusion method) was performed for analysis. Genotypically 16S rRNA, 16S and 23S intergenic transcribed spacer region, *esp*, *vanA*, *vanB* and *vanC* (C-1, C-2, C-3) was analyzed genes. When antibiotic resistance of whole isolates have been taken into consideration; the highest level of resistance was determined to cefadroxil (99.5%) while the lowest resistance was determined to imipenem (0.8%). While 9 (2.9%) of the isolates have been determined as resistant to vancomycin; genotypically vancomycin resistance gene (*van*) has been determined 20 (6.4%) of the isolates. 6 of *E. faecalis* (1 chicken, 5 gull origin) and 3 of *E. faecium* (gull origin) isolates have been determined as carrying *vanA*, 6 *E. casseliflavus/gallinarum* as carrying *vanC1* (2 chicken, 4 gull origin) and 5 *E. casseliflavus/gallinarum* (chicken origin) as carrying *vanC2/3* gene. In gull isolates, while *vanC2/3* gene was not determined in gull isolates; all chicken and gull origin isolates have been found negative for *vanB* gene. As a result, for the first time in our region, this research has revealed the presence of vancomycin-resistant *Enterococcus* species.

Keywords: Antibigram, chicken, *Enterococcus*, gull, VRE.

Giriş

Enterokoklar, Gram pozitif ve katalaz negatif koklar olup, ekosistem içinde memeliler, kuşlar, reptiller, insekt-

ler; toprakta, suda ve atık sularda, bitkilerde, gıdalarda, hayvanların ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında yer alırlar (9, 22).

* Bu makale doktora tezinden üretilmiştir.

Enterokoklar fırsatçı patojenler olup beslenme ve bakım şartlarının uygun olmadığı hayvanlarda septisemi, üriner sistem enfeksiyonu, endokarditis, ishal ve dış kulak yolu enfeksiyonuna neden olabilirler. Kanatlı hayvanlarda *E. faecalis*, *E. durans* ve *E. hirae* türlerinin akciğer hipertansiyon sendromu, eklem bozuklukları, bakteriyemi, ensefalomalazi, nörolojik bozukluklar ve endokarditis ile ilişkili enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiştir (13).

Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid, penisilin ve vankomisin direnci ortaya çıkmaktadır. Bu durum, insanlardaki enterokoklara bağlı enfeksiyonların tedavisini daha da karmaşık hale getirmektedir. Dirençli enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanabilecek kısıtlı sayıda antibiyotik bulunmakta ve bunların etkinliği henüz tam olarak kanıtlanmamaktadır (2). Bununla birlikte enterokoklar diğer Gram pozitif bakterilerin duyarlı olduğu birçok antibiyotige kısmen veya tamamen dirençlidir. Bu sebeple insan ve hayvanlarda enterokok enfeksiyonlarının tedavisi, karşılaşılan en önemli sorunlardan biridir (8, 23).

Enterokokların antibiyotiklere direnç mekanizması doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. Doğal direnç, türe ve cinse özgü olmakla birlikte enterokok türlerinin tamamında görülen kromozomal direnci ifade etmektedir. Kazanılmış direnç ise; genellikle DNA mutasyonları, transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genomu transferi sonucu gelişmektedir (22). Kazanılmış direncin belirlenmesinde önemli olan genler *vanA*, *vanB*, *vanC* (C1-C2-C3) genleridir. Bunun yanında *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* direnç genleri de belirlenen yeni direnç genleridir (20, 39).

Yüksek moleküler ağırlığa sahip, enterokok yüzey proteini (*esp*), 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geninde kodlanır ve bu gen konjugasyonla enterokok türleri arasında aktarılabilir. *Esp* proteini kolonizasyon, immün cevaptan kaçış ve biyofilm oluşturma özelliği kazandırması bakımından önemlidir (38).

Bu çalışmada, Van ili ve çevresindeki kanatlı hayvan yetiştiriciliğinin yapıldığı tavuklarda ve Van Gölü Havzasında serbest olarak yaşayan martılara ait dışkı örneklerinde enterokok türlerinin varlığı ve yaygınlığının belirlenmesi ile elde edilen izolatların çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri araştırıldı. Ayrıca, çalışmada tavuk ve martılardan izole edilen enterokok türleri antibiyotik direnç profilleri bakımından fenotipik ve vankomisin dirençlilik genleri açısından ise genotipik olarak ilk kez incelendi.

Materyal ve Metot

Bakteriyel izolasyon ve identifikasyon: Çalışmada, enterokok türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu ama-

cıyla Haziran-Eylül 2013 tarihleri arasında, tavuklardan 500 ve martılardan 500 olmak üzere toplam 1000 dışkı örneği toplandı. Dışkı örnekleri azide dextrose broth (ADB, Merck) içerisinde soğuk zincirde taşındı.

Örnekler 37°C'de 24-48 saat inkubasyondan sonra, bile eskuline agara (BEA, Himedia) ekilerek aynı şartlarda inkübe edildi. Eskulin pozitif (siyah renkli) kolonilerden, Gram pozitif kok, katalaz negatif ve PYR (L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide) testi pozitif olanlar %7 koyun kanlı agara ekilerek saflaştırıldı. PYR testi, D grubu streptokoklardan enterokokları ayırmak için kullanıldı. İzole edilen suşlar, tür tayini ve sonrasında moleküler karakterizasyon için %10'luk brain heart infüzyon broth'da (BHIB, Plasmatec) -20°C'de saklandı. İzole edilen enterokok şüpheli bakterilerin cins ve tür tayinleri Fahr ve ark. (11) yaptığı yöntem kullanılarak, BD Phoenix otomatik mikrobiyoloji sistemleri (Becton Dickinson, USA) ile gram pozitif panellerde yapıldı. Yapılan fenotipik ve genotipik testlerin tamamında standartları yakalamak için *E. faecium* BM 4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* BM 4174 (*vanC1*), *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC2*) vankomisin dirençli ve *E. faecalis* MMH594 (*esp*) referans suşları kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testi: Enterokok suşlarının 32 farklı antibiyotige duyarlılık/dirençlilik durumları Clinical and Laboratory Standards Institute (5) tarafından önerilen disk difüzyon metoduna göre yapıldı.

DNA ekstraksiyonu: Tryptic soy agar (TSA, Plasmatec) üreyen izolatlardan genomik DNA eldesi için kolon temelli hazır kit (DNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Elde edilen DNA'lar 50 µl sulandırma tamponuyla dilüe edildi ve çalışılmaya kadar -20°C'de saklandı (25).

Moleküler karakterizasyon: Enterokok türlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. İzolatların cins düzeyinde doğrulanması Kariyama ve ark. (17) bildirdikleri PZR yöntemi ile 16S rRNA (320bp) hedef alınarak gerçekleştirildi. İzolatların tür düzeyinde doğrulanması Fortina ve ark. (12) bildirdikleri yöntem ile 16S ve 23S rRNA arasındaki yaklaşık 400bp, 380bp, 300 bp büyüklüğünde bölgeler (intergenic transcribed spacer region) hedef alınarak PZR ile yapıldı. Fortina ve ark. (12) yaptıkları çalışmada tür düzeyinde yaklaşık ampikon büyüklükleri *E. italicus* 400, 380, 300; *E. faecalis* 400bp, 300bp; *E. durans* 400bp, 370bp; *E. sulfurens* 400bp, 300bp; *E. avium* 400bp, 310bp; *E. saccharolyticus* 400bp, 300bp olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada tavuk ve martı kaynaklı enterokoklarda ilk kez bu yöntem uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler Tablo 1'de verilmiştir.

Hedef gen bölgelerini çoğaltmak için, PCR reaksiyonunda hazır amplifikasyon karışımı (TopTaq Master-

Tablo 1: Bu çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler.
Tablo 1: Oligonucleotide primers used in this study.

| Gen | Primer sekansı (5', 3') | Ürün Hacmi (bp) | MspI enzim ürünleri (bp) | Referans |
|-----------------------|---|-----------------|---------------------------|----------|
| <i>vanA</i> | A1-5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3' A2-5'-GTA CAA TGC GGC AGT TA-3' | 732 | 231, 184, 163, 131/133 | 28, 35 |
| <i>vanB</i> | B1-5'-CAA AGC TCC GCA GCT TGC ATG-3 B2-5'-TGC ATC CAA GCA CCC GAT ATA C-3' | 484 | 188/189, 160, 136 | 28, 35 |
| <i>vanC-1</i> | C1-5'-GCT GAA ATA TGA AGT AAT GAC CA-3' C2-5'-CGG CAT GGT GTT GAT TTC GTT-3' | 811 | 230/237 | 28, 35 |
| <i>vanC-2, vanC-3</i> | C3D1-5'-CTC CTA CGA TTC TCT TG-3' C3D2-5'-CGA GCA AGA CCT TTA AG-3' | 439 | 338, 91 | 28, 35 |
| 16S rRNA | F 5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C-3' R 5'-TCG TTG CGG GAC TTA ACC CAA C-3' | 320 | - | 17 |
| 16S rRNA G1/L1 | L1-5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3' G1-5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3' | 400, 380, 300 | - | 12 |
| <i>esp</i> | F 5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3' R 5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGA-3' | 932 | - | 33 |

Mix, Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı. Amplifikasyon koşulları; 94°C'de 15 dk başlangıç denatürasyonun ardından, 35 döngü olmak üzere; 94°C'de 30 sn, 55°C'de 90 sn, 72°C'de 90 sn ve 72°C'de 10 dk olarak uygulandı. Elde edilen amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz jelde, 15 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforezden sonra jel, 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren 1xTBE tamponu içinde boyanarak ve bantlar UV transilluminator ile görüntülendi.

Enterokokal yüzey adhezyon molekülü geninin (esp) tespiti: Enterokokal yüzey adhezyon molekülü geni (*esp*, 932bp) tespiti, Sedgley ve ark. (34) kullandıkları yöntem ile yapıldı. Bu amaçla, PZR reaksiyonunda hazır amplifikasyon karışımı (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı ve primer bağlanma ısısı 55°C olmak üzere amplifikasyon yapıldı. Amplifikasyon ürünleri jelde elektroforeze tabi tutularak 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren 1xTBE tamponu içinde boyandı ve bantlar UV transilluminator ile görüntülendi.

mPZR-RFLP ile vanA, vanB, vanC1 ve vanC2/3 genlerinin tespiti: Enterokok türlerinin vankomisin direnç genleri, Patel ve ark. (29) ile Torres ve ark. (36)'nın bildirdikleri yöntemle araştırıldı. Direnç genlerini multipleks olarak çoğaltacak primer karışımı, her bir primerin final konsantrasyonu 0.2 µM olacak şekilde hazırlandı. Multipleks PZR reaksiyonu için hazır amplifikasyon karışımı (Qiagen Multiplex PCR Kit, Hilden, Germany) kullanıldı ve primerlerin bağlanma ısısı 60°C olarak ayarlandı. RFLP yöntemi için, 1µl MspI (10U/ml) ve 5µl 10X restriksiyon enzim buffer (Promega)'dan olmak üzere her bir PZR tüpüne eklendi. Tüpler, 13.200g 20 sn tutulduktan sonra karışım 37°C bir gece inkubasyona bırakıldı. Amplifikasyon ürünleri %1.5'luk agaroz

jel elektroforezine tabi tutularak 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren tamponda boyandı ve bantlar UV transilluminator ile görüntülendi. Elde edilen amplikon büyüklükleri *vanA* 231bp, 184bp, 163bp, 131/133bp; *vanB* 188/189bp, 160bp, 136bp; *vanC-1* 230/237bp; *vanC2/3* 338bp, 91bp olarak tespit edilmesi hedeflendi. PCR yöntemiyle elde edilen amplikon büyüklüklerinin ise *vanA* 732bp, *vanB* 484bp, *vanC-1* 811bp ve *vanC2/3* 439bp olarak tespit edilmesi hedeflendi. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler Tablo 1'de verilmiştir.

İstatistiksel analiz: İzole ve identifiye edilen enterokok türlerinin izolasyon oranlarının karşılaştırılmasında Z testinden (40) yararlanıldı. Oranların karşılaştırılmasında p<0.05 değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

Bulgular

İzolasyon ve identifikasyon sonuçları: Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole ve identifiye edilen enterokok türlerinin dağılımı ve izolasyon oranlarının karşılaştırılmalı sonuçları Tablo 2'de sunuldu. Toplam izolat sayısı ve tür düzeyindeki dağılımın oluşturduğu farklılıklar dikkat çekicidir. Tavuk dışkılarından yapılan izolasyon sonucunda baskın türün %57.3 oranla *E. faecium* olduğu görüldü. Martı dışkılarından yapılan izolasyon sonucunda ise baskın türün %65.5 oranıyla *E. faecalis* olduğu saptandı.

Antibiogram testi sonuçları: İzolatların 32 farklı antibiyotiğe direnç/duyarlılık sonuçları Tablo 3'de verildi. Tavuk ve martı kökenli izolatların benzer olarak yüksek oranda sefadroksil (CFR)'e direnç gösterdiği tespit edildi.

Tablo 2: Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen enterokok türleri.
Table 2: Chicken and gulls enterococcus species isolated from stool samples.

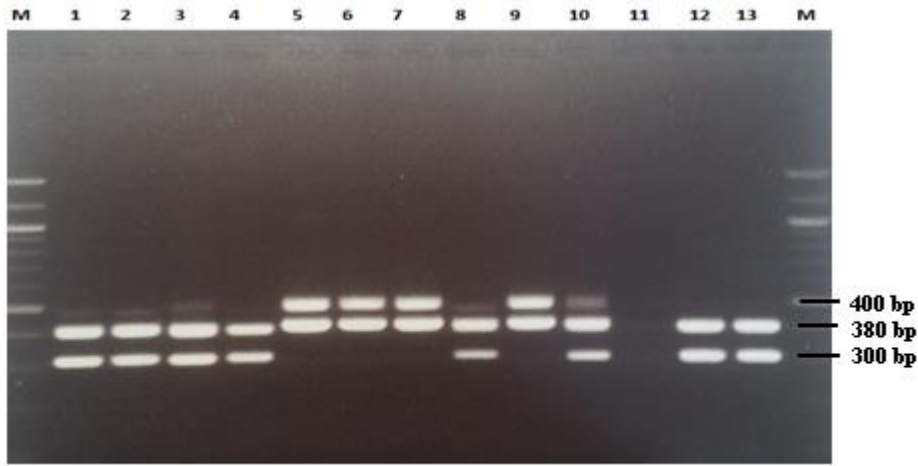
| Enterokok türü | Tavuk (n=500) | Martı (n=500) | p değeri |
|--|-------------------|-------------------|----------|
| | İzolot sayısı (%) | İzolot sayısı (%) | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 41 (21,3) | 78 (65,5) | <0,001 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 110 (57,3) | 21 (17,6) | <0,001 |
| <i>Enterococcus hirae</i> | 27 (14,1) | 10 (8,4) | 0,133 |
| <i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> | 9 (4,7) | 7 (5,8) | 0,646 |
| <i>Enterococcus raffinosus</i> | - | 2 (1,6) | 0,072 |
| <i>Enterococcus durans</i> | 5 (2,6) | 1 (0,8) | 0,271 |
| Toplam izolot sayısı | 192 (38,4) | 119 (23,8) | 0,001 |

Tablo 3: Tavuk ve martı orijinli enterokok izolatlarının antibiyogram sonuçları
Table 3: Antibiotic susceptibility results of the chicken and gulls origin enterococci

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

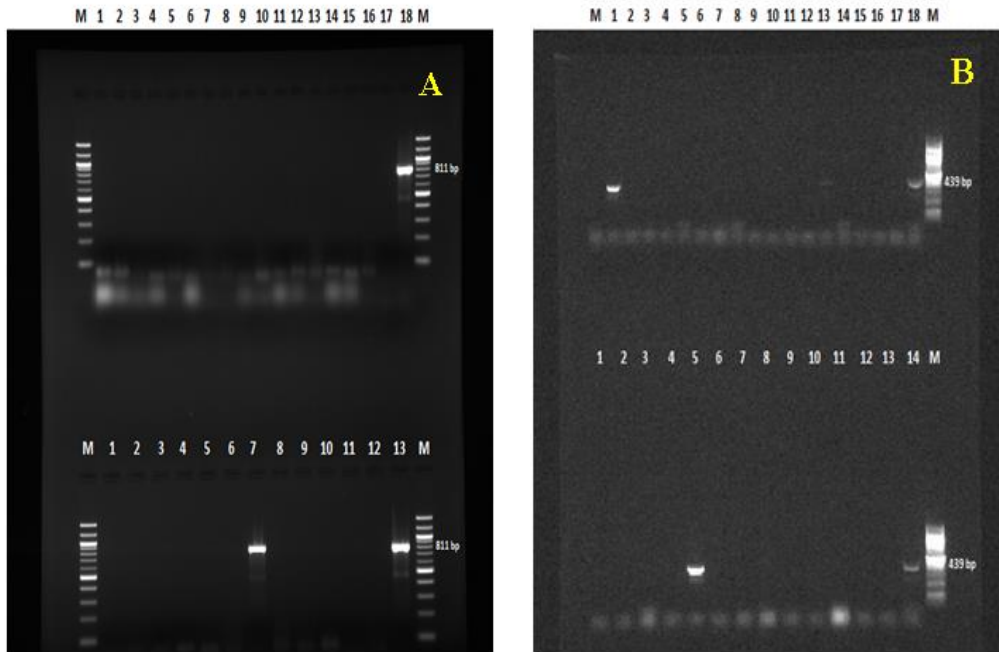
VA: vankomisin; TEC: teikoplanin; LEV: levofloksasin; PRL: piperasillin; C: kloramfenikol; MEM: meropenem; IPM: imipenem; K: kanamisin; P: penisillin; OX: oksasillin; CZ: sefazolin; CXM:sefuroksim; CFR: sefadroksil; FOX: sefoksitin; CEP: sefoperazon; CEC: sefklor; FEP: sefepim; KF: sefalothin; TOB: tobramisin;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

VA: vancomycin; TEC: teicoplanin; LEV: levofloxacin; PRL: piperacillin; C: chloramphenicol; MEM: meropenem; IPM: imipenem; K: kanamycin; P: penicillin; OX: oksasillin; CZ: cefazolin; CXM: cefuroxime; CFR: cefadroxil; FOX: cefoxitin; CEP: cefoperazone; CEC: The sefkl; FEP: cefepime; KF: sefalothin; TOBIN: tobramycin; CPD: cefpodoxime; CTX: cefotaxime; CPR: cefprozil; Q: streptomycin; SXT: trimethoprim / sulfamethoxazole; ZOX: ceftizoxime; TA: tetracyclines; AM: ampicillin; B: bacitracin; E: erythromycin; FA: fusidic acid; CN: gentamicin; EC: amikacin.



Şekil 1: *E. faecium* (380 bp, 300 bp) ve *E. hirae* (400bp, 380 bp) izolatlarına ait intergenic transcribed spacer-PZR görüntüsü. M marker (100bp): 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 ve 13 *E. faecium*; 5,6, 7 ve 9 *E. hirae*; 11 negatif kontrol (PZR suyu).

Figure 1: Intergenic transcribed spacer-PCR image of *E. faecium* (380 bp, 300 bp) and *E. hirae* (400 bp, 380 bp) isolates. M marker (100bp): 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 ve 13 *E. faecium*; 5,6, 7 ve 9 *E. hirae*; 11 negative control (PCR water).



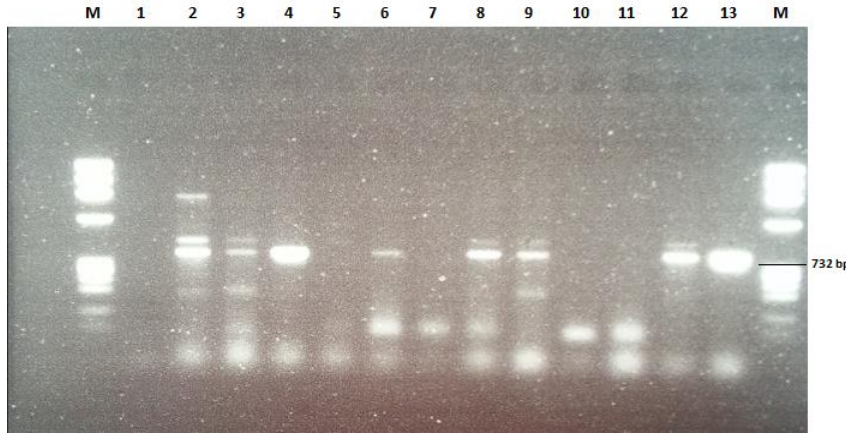
Şekil 2: **A)**Tavuk orjinli *E. casseliflavus/gallinarum* (811 bp) *vanC1* PZR görüntüsü. M marker (100 bp):1, 2, 3, 4, 5 ve 6 *E. faecium*;7 *E. casseliflavus/gallinarum*; 8, 9 *E. hirae*;10, 11 *E. faecalis*; 12 negatif kontrol (PZR suyu); 13 *E. gallinarum* BM 4174

B)Tavuk orjinli *E. casseliflavus/gallinarum* (439 bp) *vanC2/3* PZR görüntüsü. M marker (100 bp): 1, 2, 3 ve 4 *E. hirae*; 5 *E. casseliflavus/gallinarum*; 6, 7, 8, 9 ve 10 *E. faecalis*; 11 ve 12 *E. faecium*; 13 negatif kontrol (PZR suyu); 14 *E. casseliflavus* ATCC 25788

Figure 2: **A)** *vanC1* PZR image *E. casseliflavus/gallinarum* (811 bp) with chicken origin. M marker (100 bp):1, 2, 3, 4, 5 ve 6 *E. faecium*;7 *E. casseliflavus/gallinarum*; 8, 9 *E. hirae*;10, 11 *E. faecalis*; 12 negative control (PCR water); 13 *E. gallinarum* BM 4174 **B)** *vanC2/3* PCR image *E. casseliflavus/gallinarum* (439 bp) with chicken origin. M marker (100 bp): 1, 2, 3 ve 4 *E. hirae*; 5 *E. casseliflavus/gallinarum*; 6, 7, 8, 9 ve 10 *E. faecalis*; 11 ve 12 *E. faecium*; 13 negative control (PCR water); 14 *E. casseliflavus* ATCC 25788

Moleküler Karakterizasyon: Tüm izolatların cins ve tür düzeyindeki tiplendirilmesi, 16S rRNA (320bp) ile 16S ve 23S rRNA arasındaki yaklaşık 400bp, 380bp, 300 bp büyüklüğünde bölgeler (intergenic transcribed spacer region) hedef alınarak fenotipik identifikasyon genotipik olarak doğrulandı. Intergenic transcribed spacer-PZR ile

her bir enterokok türünün farklı büyüklüklerde iki bant oluşturduğu belirlendi. Bu bantların yaklaşık 400bp, 380bp ve 300bp büyüklüklerde olduğu görüldü (Şekil 1). Türlerle göre elde edilen ampikon büyüklüklerinin yaklaşık olarak *E. faecium* 380bp, 300bp; *E. hirae* 400bp, 380bp; *E. faecalis* 400bp, 300bp; *E. durans* 400bp,



Şekil 3. Martı orjinli *E. faecalis* ve *E. faecium* vanA PZR görüntüsü. M marker (100 bp): 1, 5, 10 ve 11 *E. hirae*; 2, 3, 6, 8 ve 9 *E. faecalis*; 4, 12 *E. faecium*; 7 *E. casseliflavus/gallinarum*; 13 *E. faecium* BM 4147.
Figure 3: vanA PZR image *E. faecalis* and *E. faecium* with gull origin. M marker (100 bp): 1, 5, 10 ve 11 *E. hirae*; 2, 3, 6, 8 ve 9 *E. faecalis*; 4, 12 *E. faecium*; 7 *E. casseliflavus/gallinarum*; 13 *E. faecium* BM 4147.

370bp; *E. raffinosus* 400bp, 360bp olduğu tespit edildi. Enterokok türlerinin 16S rRNA ile yapılan PZR analizinde ise 320bp büyüklüğünde tek bant oluştuğu görüldü.

esp Geni Analiz Sonuçları: İzole ve identifiye edilen 311 enterokok izolatının tamamı *esp* geni açısından negatif olarak bulundu.

mPZR-RFLP ile vanA, vanB, vanC1 ve vanC2/3 genlerinin tespiti: Tavuk orijinli 192 enterokok izolatından 8'inin *van* geni taşıdığı mPZR-RFLP ile ortaya konuldu. Bunlardan, 1 izolatın *vanA* geni, 2 izolatın *vanC1* geni ve 5 izolatın ise *vanC2/3* geni taşıdığı saptandı. *vanA* geni taşıyan izolatın *E. faecalis*, *vanC1* ve *vanC2/3* geni taşıyan izolatların ise *E. casseliflavus/gallinarum* olduğu belirlendi (Şekil 2). Benzer şekilde, martı dışkı örneklerinden izole edilen 119 enterokoktan 12'sinin *van* geni taşıdığı tespit edildi. Bunlardan 8'inin *vanA* ve 4 izolatın *vanC1* geni taşıdığı belirlendi. *vanA* geni taşıyan 8 izolatın 5'inin *E. faecalis* ve 3'ünün de *E. faecium* olduğu görüldü (Şekil 3). *vanC1* geni taşıyan 4 izolatın tamamı *E. casseliflavus/gallinarum* olarak tanımlandı.

İstatistiksel analiz: Tavuk ve martı dışkı örneklerinden izole edilen enterokok türlerinin yapılan istatistik analizleri sonucunda *E. faecalis*, *E. faecium* ve toplam izolat sayısı bakımından türler arası fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 1).

Tartışma ve Sonuç

Enterokoklar, insan ve hayvanlarda sindirim sistemi mikroflorasının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Kötü bakım, beslenme şartları ve uygunsuz antibiyotik kullanımı, mikrofloranın bozulmasına ve immün sistemin zayıflamasıyla birlikte çeşitli enterokokal enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonlar kanatlıların bir arada bulunduğu kümes veya ticari kanatlı işletmelerinde, ahır ve ağıllarda, köpek yetiştirme çiftliklerinde ve hastane ortamlarında sıklıkla görülmektedir (26, 27, 28).

Enterokok türlerinin çeşitli kanatlı türlerinde varlığı, yaygınlığı, genetik yapıları, virülens faktörleri ve antibiyotik dirençlilikleri birçok araştırma ile ortaya konulmuştur. Bu araştırmalar sonucunda tavukların, vankomisin direnç genleri taşıyan enterokoklar bakımından en önemli taşıyıcı olduğu belirlenmiştir (14, 27). Bununla birlikte, bu direnç genlerinin en çok *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* ve *E. hirae* türleri tarafından taşındığı rapor edilmiştir (19, 21).

Türkiye'deki tavuk popülasyonlarında yapılan çalışmalarda en sık izole edilen enterokok türlerinin *E. faecalis* (%34) ve *E. faecium* (%60) olduğu bildirilmiştir (9, 10). Bu çalışmada da en yaygın türün *E. faecium* (%57.3), ikinci en yaygın türün ise *E. faecalis* (%21.3) olduğu belirlendi. Bununla beraber *E. hirae* (%14.1), *E. casseliflavus/gallinarum* (%4.7) ve *E. durans* (%2.6) etkenleri de izole ve identifiye edildi. Bu türlerin insanlarda enfeksiyonlara yol açtığı da yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (35, 38).

Tavuklardan izole edilen enterokok türlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, farklı antibiyotiklere karşı direnç meydana geldiği ve bu direncin ülke, bölge ve işletme düzeyinde değişkenlik gösterdiği vurgulanmıştır (1, 9). İnsan ve hayvan sağlığında hem koruma hem de tedavi amacıyla kullanılan bu antibiyotiklere karşı gelişen direncin varlığı birçok çalışmada belirlenmiş, en yaygın görülen antibiyotik dirençliliğinin tetrasiklin (%80), eritromisin (%59), streptomisine (%22) ve gentamisin (%7) karşı olduğu bildirilmiştir (18, 33). Bu çalışmada, enterokoklarda en yüksek direncin sırasıyla sefadroksil (%99.5), sefazolin (%98.4) ve kanamisin (%96.3) karşı olduğu, tetrasiklin (%18.8) karşı direnç oranının diğer ülkelere göre düşük olduğu ve streptomisin (%83.3) ile gentamisin (%64) karşı ise direnç oranlarının yüksek olduğu belirlendi. Tavuklardan elde edilen enterokokların direnç dağılım oranlarının ülkelere göre farklılık göster-

mesi, antibiyotik kullanım politikalarının ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Çalışmada seçilen antibiyotiklerin birçoğu insanlarda görülen enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. Tavuk kaynaklı enterokok türlerinin çevresel kontaminasyon yoluyla veya gıda kaynaklı olarak insanlara bulaştığı düşünüldüğünde, bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç oranlarının bu çalışmada belirlenmesi son derece önemli olmuştur.

Fenotipik olarak identifiye edilen enterokok türlerinin genotipik doğrulanmasında PZR esaslı analizler yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle 5S rRNA, 16S rRNA ve 23S rRNA genlerinin belirlenmesiyle kültür doğrulaması yapılmaktadır (4, 10). Bu çalışmada ise tavuk ve martılardan elde edilen enterokoklarda türlerin genotipik doğrulanması 16S rRNA ile 16S ve 23S genleri arasındaki bölgelerin hedef alındığı PZR yöntemi ile başarılı bir şekilde yapıldı. Bu yöntemler ilk kez yabani martılardan elde edilen enterokok türlerinde uygulandı. İzolatların cins ve tür düzeyindeki adlandırılmalarının, geleneksel izolasyon yöntemleri kullanılarak 3-4 günde yapılırken PZR analizi ile 1-2 saatte yapılabildiği belirlendi.

esp geni, bakteriyemi, endokarditis ve üriner sistem enfeksiyonları ile ilişkili enterokoklarda yüksek oranda bulunmaktadır (30). Doğru ve ark. (10) yaptıkları çalışmada, tavuklardan elde edilen *E. faecium* izolatlarının %1.5 oranında *esp* geni taşıdığını, *E. faecalis* izolatlarının ise hiçbirinin *esp* geni taşımadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Trivedi ve ark. (37) yaptıkları çalışmada, izole ettikleri enterokok türlerinde *esp* gen oranlarını *E. faecalis*'de %10, *E. faecium*'da %4, *E. casseliflavus*'da %33, *E. mundtii*'de %50 ve *E. durans*'da %100 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada PZR yöntemi ile yapılan *esp* geni taşıyıcılığı taramasında 192 enterokok türünün hiçbirinin bu geni taşımadığı tespit edildi. *esp* geni oranlarının farklılık göstermesinde, çalışmaların farklı coğrafik bölgelerde yapılması ve buna bağlı mikrobiyal kolonizasyonun farklı olmasının etkili olduğu düşünülmüştür.

Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE), 1980'lerin sonundan itibaren görülmeye başlanmıştır (4). Kazanılmış bağışıklıkta şimdiye kadar *vanA*, *vanB*, *vanC* (C1-C2-C3) genlerinin yanında yeni izole edilen *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanM* ve *vanN* genlerinin rol oynadığı ortaya konulmuştur (3, 6, 20, 39). Kolář ve ark. (18) yaptıkları çalışmada, Çek Cumhuriyeti'ndeki tavuklarda tespit ettikleri VRE izolatlarının %54.5'inin *vanA* pozitif *E. faecium*, %27.3'ünün ise *vanB* pozitif *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları olduğunu bildirmişlerdir. Manson ve ark. (24) yaptıkları çalışmada, Yeni Zelanda'daki broylerlerden elde ettikleri vankomisin dirençli izolatların *vanA* geni taşıdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolatların

%81.8'inin *E. faecalis*, %13.6'sının *E. faecium* ve %4.5'inin ise *E. durans* olduğu belirlemişlerdir. Bu çalışmada 1 *E. faecalis* izolatının *vanA* geni taşıdığı tespit edildi. Bununla birlikte 7 izolatın *vanC1* (n=2) ve *vanC2/3* (n=5) geni taşıdığı belirlendi. 2000 yılına kadar avoparsin gibi kanatlı büyütme yem katkı maddeleri Avrupa ve Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Ülkemizde ise 1997 yılında bu katkı maddelerinin kullanımını yasaklanmıştır. Bu maddelerin kullanıldığı dönemde vankomisin dirençli enterokok oranları yüksek bulunmuştur. Dünya ülkelerinde yapılan çalışmalar ile bu çalışmadaki sonuçların farklı olmasının sebebinin bu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsanlar ve evcil hayvanlar arasındaki antibiyotiğe dirençli bakteri geçişi ve bu bakterilerin gen özellikleri arasındaki farklılıklar çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (7, 16). Fakat yabani hayvanlara antibiyotik direncinin geçişi noktasında önemli görülen çevresel kontaminasyon ile ilgili bilgiler sınırlıdır (33). Gülhan ve ark. (15) Van gölü havzasındaki sulak alanlarda yaptıkları çalışmada, yabani ördek ve martılardaki dışkı örneklerinden *E. faecium* (%6.4) ve *E. faecalis* (%2) izole ve identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bölgede çevresel kontaminasyonun varlığını tespit ettiklerini ve yabani ördek ve martıların bu kontaminasyonun sebepleri arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Enterokok türlerinin varlığı çeşitli yabani kanatlı hayvanlarda detaylı şekilde araştırılmıştır (28, 33). Bu araştırmalar sonucunda yabani kanatlıların VRE bakımından önemli bir taşıyıcı olduğu belirtilmiştir (32, 33). Bununla birlikte bu direnç genlerinin en çok *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ve *E. gallinarum* türleri tarafından taşındığı rapor edilmiştir (15, 33). Bu konuda Radhouani ve ark. (31) yaptıkları çalışmada, akbabalardan (*Buteo buteo*) aldıkları dışkı örneklerinde VRE belirlemişler ve izolatların %33'ünün *E. faecium*, %66'sının ise *E. durans* olduğunu rapor etmişlerdir. Ülkemizde Gülhan ve ark. (15) yaptıkları çalışmada, yabani ördek ve martılara ait 357 dışkı örneğinde 23 (%6.4) *E. faecium* ve 7 (%2) *E. faecalis* izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise Van Gölü Havzası'ndaki sulak alanlarda 500 yabani martı dışkı örneğinde enterokok etken izolasyonu yapıldı. Yapılan izolasyon sonucunda 119 enterokok türü elde edildi. Bu etkenlerin yapılan identifikasyonunda 78 (%65.5) *E. faecalis*, 21 (%17.6) *E. faecium*, 10 (%8.4) *E. hirae*, 7 (%5.9) *E. casseliflavus/gallinarum*, 2 (%1.7) *E. raffinosus* ve 1 (%0.8) *E. durans* tespit edildi. Yapılan çalışmalarda izolasyon oranlarındaki bu farklılığın, seçilen kanatlı hayvan türü ve kullanılan farklı izolasyon yöntemleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Yabani kanatlılardan izole edilen enterokok türlerinde yapılan çeşitli çalışmalarda, farklı antibiyotiklere karşı direnç meydana geldiği belirtilmiştir (28, 37). Bu

konuyla ilgili Radhouani ve ark. (31) yaptıkları çalışmada, *vanA* geni içeren izolatların tamamının vankomisine ve teikoplanine yüksek dirençli olduğu, bununla birlikte tüm izolatların tetrasikline ve eritromisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu suşların %83.3'nün siprofloksasin ve ampisiline aynı anda dirençli olduğunu, %16.6'sının ise kanamisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Oravcova ve ark. (28) yaptıkları çalışmada, elde ettikleri izolatlardan %71'inin bir veya daha fazla ilaca direnç gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, izolatların %32.3'ünün gentamisine ve %30.6'sının tetrasikline karşı dirençli olduğu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, en yüksek direncin sefadroksil (%99.2), amikasin (%95) ve sefpodoksim (%92.4), olduğu ortaya konuldu. En düşük direncin ise imipeneme (%0.8) ve ampisiline (%1.6) olduğu tespit edildi. Antibiyotik dirençlerindeki bu farklılığın, yabani kanatlıların buldukları kontamine çevrede farklı antibiyotiklere dirençli enterokok türlerine maruz kalma durumları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Yabani kanatlılarda virülens faktörleriyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (15, 31). Radhouani ve ark. (31) tarafından yapılan çalışmada, enterokok türlerine ait virülans faktörleri değerlendirilmiş, hiçbir izolatın *esp* geni taşımadığı belirlenmiştir. Gülhan ve ark. (15) yaptıkları çalışmada, yabani ördek ve martılardan elde ettikleri enterokok türlerinde çeşitli virülens faktörleriyle ilgili araştırmalar yapmışlar, elde ettikleri *E. faecium* izolatlarının %78.3'ünün jelatinaz, %17.4'ünün sitolizin, %8.7'sinin agregasyon faktör; *E. faecalis* izolatlarının %57.1'inin jelatinaz ve sitoloizin, %14.3'ünün agregasyon faktör açısından pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar elde ettikleri enterokok izolatlarında *esp* geni varlığını araştırmamışlardır. Bu çalışmada yabani martılardaki *esp* geni moleküler olarak ilk kez analiz edildi. PZR yöntemi ile yapılan *esp* geni taramasında 119 izolatın hiçbirinin bu geni taşımadığı belirlendi. Dünya çapında yabani kanatlılarda bulunan sonuçlar ile bu çalışmadaki sonuçlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Yaban hayat içerisinde *esp* geni taşıyan enterokok türlerine maruz kalma durumunun çok az olduğu düşünülmektedir.

Yabani kanatlılarda, tavuklarda olduğu gibi *vanA*, *vanB*, *vanC* (C1-C2-C3) genleri çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır (28, 31). Radhouani ve ark. (31) yaptıkları çalışmada, %18.2 VRE izole edilmiş, *E. durans*'ın baskın tür olduğu ortaya konulmuş ve izolatların *vanA* geni taşıdığı rapor edilmiştir. Bununla paralel olarak Oravcova ve ark. (28) yaptıkları çalışmada, elde ettikleri izolatların %75.8'inde *vanC1*, %12.9'unda *vanA*, %1.6'sında ise *vanC2* geni tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *vanA* geni tespit edilen VRE izolatlarının tamamının *E. faecium* olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca izolatların hiçbirinin *vanB* geni taşımadığını ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada 5 (%41.7) *E. faecalis* ve 3 (%25) *E. faecium* izolatının, *vanA* ve 4 (%33) *E. casseliflavus/gallinarium*

izolatının *vanC1* geni taşıdığı tespit edildi. Bununla birlikte izolatların hiçbirinin *vanB* ve *vanC2/3* genlerini içermediği belirlendi. Dünya çapında martılarla ilgili ilk kez vankomisin direnç geni taşıyıcılık oranları ortaya konulmuştur. Bundan dolayı elde edilen oranlar farklı yabani kanatlı hayvanlara ait bulgularla tartışılmıştır. Yabani kanatlı hayvanların arasındaki sonuç farklılıklarının maruz kaldıkları hayvan ile insan popülasyonları ve beslenme şekilleri sonucunda oluştuğu düşünülmektedir.

Martı ve tavuk dışkılarından izole edilen enterokok türlerinin gösterdikleri farklılıklar, istatistiksel sonuçlar dikkate alınarak çalışmada ortaya konuldu. Tavuk dışkı örneklerinden 192 enterokok türü izole edilirken martı dışkı örneklerinden 119 enterokok türü izole edildi. Bu farklılığın yapılan istatistiksel analiz sonucu önemli olduğu ortaya konuldu. Tavuk ve martılardan izole edilen *E. faecium* (%57.3, %17.6) ve *E. faecalis* (%21.3, %65.5) oranları arasında farklılığın yapılan istatistiksel analiz sonucu önemli olduğu ortaya konuldu. İstatistiksel analiz sonucunda oluşan bu farklılığın yaşam şekli, beslenme, farklı bölgelerdeki insan ve hayvan popülasyonlarına maruz kalma durumu gibi faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Van Gölü Havzası ve çevresinde bulunan köy tavukları ve martıların çoklu antibiyotik dirençli enterokok yönünden önemli taşıyıcılar olduğu belirlendi. Köy tavukları ve martılardan izole edilen antibiyotiklere dirençli enterokok suşlarında farklı *van* genlerinin varlığı ortaya konuldu. Antibiyotik direnç genlerine sahip enterokok türlerinin, dışkı ile kontamine tavuk gıdaları ve martı dışkısına temas yoluyla insanlara aktarabileceği riski öngörüldü. Martıların uzun mesafeler uçabilmesi, su ve karada yaşaması, diğer yabani hayvanlarla aynı ortamı paylaşması ve insan popülasyonu ile en çok ilişki kuran hayvanlar olması bu riski daha da artıracığı düşünüldü. Köy tavukları ve yabani kanatlılarda antibiyotiklere karşı direncin oluşması ve bakterilerdeki antibiyotik dirençliliğinin engellenmesi için, çok merkezli epidemiyolojik çalışmalar yapılarak patojen ve flora bakterilerindeki antibiyotik direnç durumunun sürekli takip edilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Aarestrup FM, Agero Y, Gerner-Smidt P, et al. (2000): Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diag Micro Infect Dis*, **37**, 127-137.
2. Alp Ş, Şardan YÇ (2008): Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hacettepe Med J*, **39**, 89-95.
3. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, et al. (2008): Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agent Chemoter*, **52**, 2667-2672.

4. **Brisse S, Fussing V, Ridwan B, et al.** (2002): *Automated ribotyping of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates*. JCM, **40**, 1977-1984.
5. **CLSI** (2011): *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first edition: Informational Supplement. CLSI document M100-S21*. CLSI. Wayne, PA, USA.
6. **Courvalin P** (2006): *Vancomycin resistance in Gram-positive cocci*. CID, **42**, 25-34.
7. **De Leener E, Martel A, De Graef EM, et al.** (2005): *Molecular analysis of human, porcine, and poultry Enterococcus faecium isolates and their erm (B) genes*. AEM, **71**, 2766-2770.
8. **Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, et al.** (2007): *Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program*. Diag Microb Infect Dis, **58**, 163-170.
9. **Dilik Z, İstanbulluoğlu E** (2010): *Entansif broyler işletmeleri ile kırsal tavukçuluk işletmelerindeki hayvanlardan izole edilen enterokokların fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar*. Bornova Vet Bil Derg, **32**, 37-46.
10. **Doğru AK, Gençay YE, Ayaz ND** (2010): *Comparison of virulence gene profiles of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis chicken neck skin and faeces isolates*. Kafkas Univ Vet Fak Derg, **16**, 129-133.
11. **Fahr AM, Eigner U, Armbrust M, et al.** (2003): *Two-center collaborative evaluation of the performance of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterococcus spp. and Staphylococcus spp.* JCM, **41**, 1135-1142.
12. **Fortina MG, Ricci G, Mora D, et al.** (2004): *Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals Enterococcus italicus sp. nov.* IJSEM, **54**, 1717-1721.
13. **Frye JG, Jackson CR** (2013): *Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in Salmonella enterica, Escherichia coli, and Enterococcus spp. isolated from US food animals*. Front Microbiol, **4**, 135.
14. **Garcia-Migura L, Pleydell E, Barnes S, et al.** (2005): *Characterization of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates from and broyler poultry and pig farms in England and Wales*. JCM, **43**, 3283-3289.
15. **Gülhan T, Boynukara B, Durmus A, et al.** (2012): *Enteric bacteria and some pathogenic properties of Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium and Escherichia coli strains isolated from wild ducks and gulls*. FEB, **21**, 1961-1966.
16. **Hayes JR, English LL, Carter PJ, et al.** (2003): *Prevalance and antimicrobial resistance of enterococcus species isolated from retail meats*. AEM, **69**, 7153-7160.
17. **Kariyama R, Mitsuata R, Chow JW, et al.** (2000): *Simple and reliable Multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci*. JCM, **38**, 3092-3095.
18. **Kolář M, Pantůček R, Bardůň J, et al.** (2002): *Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry*. Vet Med Czech, **47**, 52-59.
19. **Lauderdale TL, Shiao YR, Wang HY, et al.** (2007): *Effect of banning vancomycin analogue avoparcin on vancomycin-resistant enterococci in chicken farms in Taiwan*. Environ Microbiol, **9**, 819-823.
20. **Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, et al.** (2011): *D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrob Agent Chemoter, **55**, 4606-4612.
21. **Lim SK, Tanimoto K, Tomita H, et al.** (2006): *Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in Enterococcus faecalis isolates from humans and chicken feces*. AEM, **72**, 6544-6553.
22. **Lukášová J, Šustáčková A** (2003): *Enterococci and antibiotic resistance*. Acta Vet Brno, **72**, 315-323.
23. **Mac K, Wichmann-Schauer H, Peters J, et al.** (2003): *Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR*. Int J Food Microbiol, **88**, 305-309.
24. **Manson JM, Smith JMB, Cook GM** (2004): *Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broylers after discontinuation of avoparcin use*. AEM, **70**, 5764-5768.
25. **Mansur A, Ay S, Otlu B, et al.** (2013): *Karbapenem dirençli Pseudomonas aeruginosa izolatlarında metallo beta laktamaz üretiminin araştırılması*. J Turgut Ozal Med Cent, **20**, 237-242.
26. **Nam S, Kim MJ, Park C, et al.** (2013): *Detection and genotyping of vancomycin-resistant Enterococcus spp. by multiplex polymerase chain reaction in Korean aquatic environmental samples*. IJHEH, **216**, 421-427.
27. **Ongut G, Kilinckaya H, Baysan BO, et al.** (2013): *Evaluation of Brilliance VRE agar for the detection of vancomycin-resistant enterococci in rectal swab specimens*. J Med Microbiol, **62**, 661-662.
28. **Oravcova V, Ghosh A, Zurek L, et al.** (2013): *Vancomycin-resistant enterococci in rooks (Corvus frugilegus) wintering throughout Europe*. Environ Microbiol, **15**, 548-556.
29. **Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al.** (1997): *Multiplex PCR detection of vanA, vanB, vanC-1, and vanC2/3 genes in enterococci*. JCM, **35**, 703-707.
30. **Poeta P, Costa D, Klibi N, et al.** (2006): *Phenotypic and genotypic study of gelatinase and β -haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal*. J Vet Med, **53**, 203-208.
31. **Radhouani H, Pinto L, Coelho C, et al.** (2010): *MLST and a genetic study of antibiotic resistance and virulence factors in vanA-containing Enterococcus from buzzards (Buteo buteo)*. SFAM, **50**, 537-541.
32. **Radu S, Toosa H, Rahim RA, et al.** (2001): *Occurrence of the vanA and vanC2/3 genes in Enterococcus species isolated from poultry sources in Malaysia*. Diag Microbiol Infect Dis, **39**, 145-153.
33. **Santos T, Silva N, Igrejas G, et al.** (2013): *Dissemination of antibiotic resistant Enterococcus spp. and Escherichia coli from wild birds of Azores Archipelago*. Anaerobe, **24**, 25-31.
34. **Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al.** (2005): *Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp.* Oral Microbiol Immunol, **20**, 10-19.
35. **Song JH, Ko KS, Oh WS, et al.** (2006): *High frequency of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates*

- with *VanB* phenotype and *vanA* genotype in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **56**, 401-406.
36. **Torres C, Escobar S, Portillo A, et al.** (2006): *Detection of clonally related vanB2- containing Enterococcus faecium strains in two Spanish hospitals*. *J Med Microbiol*, **55**, 1237-1243.
37. **Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R** (2011): *Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs*. *Veterinari Medicina*, **56**, 352-357.
38. **Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, et al.** (2012): *Difference in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin*. *Microb Pathog*, **52**, 336-343.
39. **Xu X, Lin D, Yan G, et al.** (2010): *vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 4643-4647.
40. **Zar JH** (1999): *Biostatistical Analysis, Fifth Edition*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.

Geliş tarihi: 16.06.2015 / Kabul tarihi: 12.01.2016

Yazışma adresi:

Dr. Ömer AKGÜL

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

65080 Kampüs, Van-TÜRKİYE

e-mail: omerakgul@yyu.edu.tr