

PİLİÇ ETİNDEN İZOLE EDİLEN YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİT DİRENÇLİ ENTEROKOKLARIN ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ*

Meltem Yalçın, Yasin Tuncer**

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / Received: 02.04.2021; Kabul / Accepted: 11.05.2021; Online baskı / Published online: 15.05.2021

Yalçın, M., Tuncer, Y. (2021). Piliç etinden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozit dirençli enterokokların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi. GIDA (2021) 46 (4) 803-816 doi: 10.15237/gida. GD21063

Yalçın, M., Tuncer, Y. (2021). Determination of the antibiotic resistance profiles of high-level aminoglycosid-resistant enterococci isolated from broiler meat. GIDA (2021) 46 (4) 803-816 doi: 10.15237/gida. GD21063

ÖZ

Bu çalışmada, Antalya ve Isparta illerinden temin edilen 112 piliç eti örneğinde yüksek seviyede aminoglikozit dirençli (YSAD) *Enterococcus* yaygınlığı araştırılmış ve izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir. Çalışmada toplam 32 YSAD *Enterococcus* suşu izole edilmiştir. Moleküler yöntemler ile izolatların 18'i *E. faecium*, 5'i *E. faecalis*, 5'i *E. durans*, 3'ü *E. avium* ve 1'i *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon testi sonucu, izolatların en duyarlı olduğu antibiyotiklerin ampisilin (%93.75), linezolid (%93.75), penisilin G (%90.62), teikoplanin (%90.62), nitrofurantoin (%78.12), vankomisin (%75) ve kloramfenikol (%68.75) olduğu belirlenmiştir. İzolatların en dirençli olduğu antibiyotiklerin ise eritromisin (%96.87), minosiklin (%96.87), streptomisin (%96.87) ve tetrasiklin (%96.87) olduğu tespit edilmiştir. İzolatların gentamisin ve streptomisin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin sırasıyla 16 ile >4096 ve 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. MİK testleri sonucu, 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'inin hem yüksek seviyede streptomisin dirençli (YSSD) hem de yüksek seviyede gentamisin dirençli (YSGD) oldukları tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Piliç eti, *Enterococcus*, yüksek seviyede aminoglikozit direnci, antibiyotik direnç, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

DETERMINATION OF THE ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES OF HIGH-LEVEL AMINOGLYCOSID-RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATED FROM BROILER MEAT

ABSTRACT

In this study, the prevalence of high-level aminoglycoside-resistant (HLAR) *Enterococcus* in broiler meat samples obtained from Antalya and Isparta provinces was investigated and antibiotic resistance

*Bu çalışma Meltem Yalçın'ın yüksek lisans tez çalışmasından alınmıştır. Bu çalışmanın bir kısmı 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi (IHSLC 2018) Burdur/Türkiye'de sözlü sunum olarak sunulmuş ve kongre kitabında bildiri olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Meltem Yalçın. This study was presented as a oral presentation at the 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018) Burdur/Turkey, and a part of this study was published in the book of proceedings.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉: yasintuncer@sdu.edu.tr

☎: (+90) 246 211 1713

☎: (+90) 246 237 0437

Meltem Yalçın; ORCID no: 0000-0001-5320-032X

Yasin Tuncer; ORCID no: 0000-0002-2075-5027

profiles of isolates was detected. A total of 32 HLAR *Enterococcus* strains were isolated in this study. Isolates were identified as 18 *E. faecium*, 5 *E. faecalis*, 5 *E. durans*, 3 *E. avium* and 1 *E. casseliflavus* by molecular methods. As a result of the disc diffusion test, HLAR *Enterococcus* isolates were found to be most susceptible to ampicillin (93.75%), linezolid (93.75%), penicillin G (90.62%), teikoplanine (90.62%), nitrofurantoin (78.12%), vancomycin (75%) and chloramphenicol (68.75%). It has been determined that the antibiotics to which the isolates are most resistant are erythromycin (96.87%), minocycline (96.87%), streptomycin (96.87%), and tetracycline (96.87%). Gentamicin and streptomycin minimum inhibitory concentration (MIC) values of HLAR isolates were detected changing in the ranged from 16 to >4096 and 64 to >4096 µg/mL, respectively. According to the MIC test results, 18 out of 32 HLAR isolates were identified as both high-level gentamicin-resistant (HLGR) and high-level streptomycin-resistant (HLSR).

Keywords: Broiler meat, *Enterococcus*, high-level aminoglycoside resistance, antibiotic resistance, polymerase chain reaction (PCR)

GİRİŞ

Enterokoklar Gram pozitif, spor oluşturmeyen, katalaz ve oksidaz negatif, fakültatif anaerob ve kok morfolojisine sahip bakterilerdir. Enterokoklar çevrede çok geniş bir alana yayılmış olup, ekosistem içerisinde memelilerden, kuşlardan, kanatlılardan, insan ve hayvan sindirim sisteminden, topraktan, yüzey sularından, bitkilerden ve çeşitli fermente gıdalardan izole edilebilmektedirler (Devriese ve Pot, 1995). Enterokoklar farklı sıcaklık ve pH derecelerine dayanıklı olmalarının yanında ekstrem tuz konsantrasyonunda da gelişebilme yeteneklerinden dolayı fermente gıdalardan yüksek sıklıkla izole edilebilmektedirler (Cariolato vd., 2008; Özden Tücer vd., 2013; Demirgöl ve Tücer, 2017; Hanchi vd., 2018). Enterokoklar lipolitik ve esterolitik aktivite göstermelerinin yanı sıra, sitratın yıkımı ve uçucu aromatik bileşikler oluşturabilme gibi özellikleri ile bazı gıdaların tat, renk ve koku gibi organoleptik özelliklerini iyileştirmekte ve geliştirmektedirler. Bu nedenle, diğer laktik asit bakterileri ile birlikte fermente süt ve et ürünlerinde doğal starter kültür olarak kullanılabilmektedirler (Giraffa, 2002; Hugas vd., 2003).

Enterokokların bazı fermente gıdalarda starter kültür olarak aktif rol almalarının yanı sıra bağışıklık sistemi zayıflamış insanlarda bakteriyemi, endokarditis, idrar yolu enfeksiyonları gibi nozokomiyal hastalıklara sebep oldukları bilinmektedir. Enterokoklar primer patojenler olarak değerlendirilmemelerine rağmen antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç gösterme yeteneklerine bağlı olarak dünya

genelinde nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Linden ve Miller, 1999). Enterokokların birçok antibiyotiğe karşı doğal (intrensek) direnç göstermelerinin yanı sıra klinik olarak önemli farklı grup antibiyotiklere karşı da kolaylıkla direnç kazanabilmeleri bu bakterilerin patojenitesini artıran önemli bir etkidir (Yogurtcu ve Tücer, 2013; Abauehnaga vd., 2016). Enterokoklar başta β-laktamlar ve aminoglikozitler olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı doğal dirence sahiptirler (Garrido vd., 2014). Gentamisin ve streptomisin klinik uygulamalarda kullanılan iki önemli aminoglikozit grubu üyesi antibiyotiktir. Genel olarak enterokoklar, düşük hücresel geçirgenliklerinden dolayı aminoglikozitlere karşı orta seviyede doğal direnç gösterirler (Bismuth ve Courvalin, 2010; Niu vd., 2016). Diğer taraftan son yıllarda yapılan çalışmalar ile klinik örneklerin (Niu vd., 2016; Shete vd., 2017) yanı sıra tavuk eti (Choi ve Woo, 2013), et ve et ürünleri (Jaimee ve Halami, 2016), çiğ süt ve peynir (Özdemir ve Tücer, 2020) gibi gıda maddelerinden de yüksek seviyede gentamisin (YSGD) (MİK≥500 µg/mL) ve streptomisin dirençli (YSSD) (MİK≥2000 µg/mL) bakterilerin izole edildiği rapor edilmiştir. Aminoglikozitler yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde, tedavi yöntemlerinin önemli bir bileşeni olmuştur. Bu nedenle bakterilerde yüksek seviyede aminoglikozit direncinin yaygınlaşması enfeksiyonların tedavisinde sorunlara yol açma riskini beraberinde getirmektedir (Yao ve Moellering, 2007). Aminoglikozit direnci hücrede aynı anda var olabilen 16S rRNA veya ribozomal proteinlerin mutasyonu yoluyla hedefin modifikasyonu, 16S

rRNA'nın metilasyonu, dış membranın geçirgenliğinin modifikasyonu veya azalmış iç membran taşınmasıyla geçirgenliğin azalması, aktif akış pompaları ile antibiyotığın hücre dışına aktarımı, çok düşük aktiviteye sahip bir asetiltransferaza sıkıca bağlanarak antibiyotığın sekestrasyonu ve antibiyotik molekülünün enzimatik inaktivasyonu gibi birkaç mekanizma yoluyla oluşabilmektedir (Ramirez ve Tolmasky, 2010). Yararlı mikroflorayı oluşturan laktik asit bakterilerinin klinik olarak önemli aminoglikozit grubu ilaçlara karşı direnç kazanması ciddi endişe uyandırmaktadır (Jackson vd., 2011; Özdemir ve Tuncer, 2020).

Bu çalışmada Isparta ve Antalya illerinden temin edilen piliç eti örneklerinde YSAD *Enterococcus* suşlarının yaygınlığı araştırılmış ve izolatların antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir. Ayrıca izolatların gentamisin ve streptomisin MİK değerleri tespit edilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Piliç eti örnekleri

Çalışmada kullanılan 112 piliç eti örneği (39 kanat, 37 göğüs, 20 but, 16 bagnet) Antalya ve Isparta illerinde bulunan kasap ve marketlerden 2017 yılı Haziran-Ağustos aylarını kapsayan 3 aylık zaman aralığında temin edilmiştir. Piliç eti örnekleri soğuk zincir altında laboratuara getirilmiş ve aynı gün analiz edilmiştir.

YSAD muhtemel *Enterococcus* suşlarının izolasyonu

YSAD *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için piliç eti örneklerinden 25 g aseptik koşullar altında tartılmış ve steril çelik blenderda (Waring Commercial 8011 ES, Torrington, CT, ABD), 225 mL fizyolojik tuzlu su (FTS) çözeltisi (FTS, %0.85 NaCl, w/v) ile homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan bu dilüsyondan 100 µL alınarak YSGD *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için 500 µg/mL gentamisin, YSSD *Enterococcus* suşlarının izolasyonu için ise 2000 µg/mL streptomisin içeren iki farklı Enterococcosel agar (Becton Dickinson, Almanya) ve MRS agar besiyeri ortamlarına aktarılmış ve Drigalski spatülü ile yüzeye yayılmıştır. Petri kutuları 37°C'de 2-5 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda Enterococcosel agar ortamında kahve rengi-siyah merkezli etrafında kahve rengi zon görülen, MRS agar ortamında ise gelişme gösteren bütün koloniler YSGD veya YSSD muhtemel *Enterococcus* izolatı olarak düşünülmüştür. Daha sonra koloniler izole edildikleri konsantrasyonda gentamisin veya streptomisin ilave edilmiş MRS broth besiyeri ortamında kültüre edilmiştir. İzolatların saflık kontrolleri Enterococcosel agar besiyeri ortamında yapılmıştır.

YSAD muhtemel *Enterococcus* izolatlarının tanısı

Morfolojik tanı ve katalaz testi

YSAD muhtemel *Enterococcus* izolatlarının mikroskopik morfolojileri Gram boyama metodu ile hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda (Leica DM500, Almanya) incelenmesi ile belirlenmiştir (Temiz, 1994). Mikroskopik morfolojileri belirlenen izolatların katalaz testleri %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisi kullanılarak tespit edilmiştir (Temiz, 1994). Katalaz testinde *S. aureus* ATCC 25923 suşu pozitif, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kültürel testler

İzolatların *Enterococcus* cinsi üyesi olup olmadıklarının belirlenmesi için kültürel testler yapılmıştır. Kültürel testler için izolatlar MRS broth ortamında 37°C'de 18 saat geliştirildikten sonra %6.5 (w/v) NaCl ilave edilmiş ve pH'sı 9.6'ya ayarlanmış iki ayrı MRS broth ortamına inoküle edilmiş ve 37°C'de 18 saat kültüre edilmiştir (Manero ve Blanch, 1999). Bu testlere ek olarak izolatların MRS broth ortamında 10°C ve 45°C'de gelişme özellikleri ve 60°C'de 30 dakika sıcaklık uygulaması sonrası hayatta kalmaları test edilmiştir (Morandi vd., 2006).

Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için YSAD izolatları MRS broth ortamında 37°C'de 18 saat süre ile geliştirilmiştir. Bu kültürlerden steril Eppendorf tüplerine 0.5 mL aktarılmış ve hücreler 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya) edilmiştir. Hücre çöktelleri

0.5 mL liziz çözeltisi ile çözülmüş ve tüpler su banyosu (Nüve NB9, Türkiye) içerisinde 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, % 10 w/v) ilave edilmiş ve 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda (Nüve NB5) 5 dakika tutulmuştur. Süre sonunda lize olan hücre süspansiyonları üzerine 0.7 mL fenol-kloroform (1:10) ilave edilerek 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst faz alınarak yeni steril Eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 0.7 mL 2-propanol ilave edildikten sonra tüpler bir kez daha 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan çökelti 50 µL Tris-EDTA (pH 8.0) içerisinde çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Cancilla vd., 1992).

Genomik DNA örneklerinin elektroforezi % 0.7 (w/v) agaroz içeren jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemi tris-asetat elektroforez tamponu eşliğinde OWL EASYCAST B2 yatay elektroforez jel sisteminde (Thermo Fisher Scientific, ABD) gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi, 85 voltta 1.5-2 saat süreyle yapılmıştır. Jel 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, ABD) içeren çözeltide 45 dakika boyanmıştır. Boyanmış jeller, 312 nm dalga boyunda ultraviyole ışık (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) altında incelenerek Nikon D5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Corp. Japonya) kullanılarak fotoğraflanmıştır.

YSAD izolatların cinsine özgü primerler ile cins düzeyinde tanısı

YSAD izolatların cins düzeyinde tanısı Çizelge 1'de verilen *Enterococcus* cinsine özgü primer çifti kullanılarak TurboCycler 2 (Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) gradient termal döngü cihazında yapılmıştır. PZR işlemi toplam 50 µL PZR karışımı (25 µL 2x PCR master miks (Thermo #K0171, Litvanya), 20 µL nükleaz içermeyen su, 3 µL kalıp DNA, 1 µL ileri primer ve 1 µL geri primer) kullanılarak 1 döngü başlangıç denatürasyonu (95°C'de 15 dakika), 40 döngü çoğalma (95°C'de 15 saniye, 62°C'de 1 dakika, 72°C'de 30 saniye) ve 1 döngü son uzama (72°C'de 10 dakika) aşamalarından oluşan

protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Sahoo vd., 2015).

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin elektroforezi OWL EASYCAST B2 (Thermo) yatay elektroforez tankı kullanılarak % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış ve fragment büyüklükleri O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo #SM1153) kullanılarak hesaplanmıştır. Jeller etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır.

YSAD Enterococcus izolatlarının türe özgü primerler ile tür düzeyinde tanısı

YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısında Jackson vd. (2004a) tarafından önerilen *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* ve *E. mundtii* türlerine özgü primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 1). PZR denemelerinde 1 döngü başlangıç denatürasyonu (95°C'de 4 dakika), 30 döngü çoğalma (95°C'de 30 saniye, 55°C'de (*E. mundtii* için 60°C) 1 dakika, 72°C'de 1 dakika) ve 1 döngü son uzama (72°C'de 7 dakika) aşamalarından oluşan protokol kullanılmıştır. PZR denemelerinde Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilen *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 51559, *E. durans* NYE4, *E. casseliflavus* DYE1 ve *E. gallinarum* DYE26 suşları kontrol olarak kullanılmıştır. Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi OWL EASYCAST B2 (Thermo) yatay elektroforez tankında % 2 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemini takiben jeller etidyum bromit (Amresco) ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo) kullanılmıştır.

16S rDNA dizi analizi

Türe özgü spesifik primer kullanılarak tür düzeyinde tanısı yapılamayan 3 izolatın (MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1) tür düzeyinde tanısı 16S rDNA dizi analizi ile yapılmıştır. PZR işlemi TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazında (Blue-Ray Biotech) gerçekleştirilmiştir. Enterokok suşlarında 16S rDNA bölgesi,

Edwards vd. (1989) tarafından önerilen pA (ileri) ve pE' (geri) genel bakteri primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır (Çizelge 1). PZR işleminde 1 döngü başlangıç denatürasyonu (94°C'de 2 dakika), 30 döngü çoğalma (94°C'de 30 saniye, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 90 saniye) ve 1 döngü son uzama (72°C'de 10 dakika) aşamalarından oluşan protokol kullanılmıştır. Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi yatay elektroforez tankında % 1 agaroz (w/v) oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Elektroforez işlemini takiben jeller etidyum bromit (Amresco)

ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo) kullanılmıştır. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi Oligomer Biyoteknoloji A.Ş.'de (ODTÜ, Teknokent, Ankara, Türkiye) yaptırılmıştır. Sekans işleminde Applied Biosystems® AB 3730XL (Thermo, ABD) otomatik gen sekans cihazı kullanılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST programı kullanılarak tespit edilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan primer dizileri ve ürün büyüklükleri
Table 1. Primers sequences and product sizes used in this study

Gen <i>Gene</i>	Primer dizisi (5' - 3') <i>Primer sequences (5' - 3')</i>	Ürün boyutu (bp) <i>Product size (bp)</i>	Kaynak <i>Reference</i>
<i>Enterococcus</i>	f: TACTGACAAACCATTCATGATG r: AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	Sahoo vd. 2005
<i>E. casseliflavus</i>	f: TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC r: GCTAGTTTACCGTCITTAACG	288	Jackson vd. 2004a
<i>E. durans</i>	f: CCTACTGATATTAAGACAGCG r: TAATCCTAAGATAGGTGTTTG	295	Jackson vd. 2004a
<i>E. faecalis</i>	f: ACTTATGTGACTAACTTAACC r: TAATGGTGAATCITGGTTTGG	360	Jackson vd. 2004a
<i>E. faecium</i>	f: GAAAAACAATAGAAGAATTAT r: TGCITTTTTGAATTCITCITTA	215	Jackson vd. 2004a
<i>E. gallinarum</i>	f: TTACTTGCTGATTTTGATTCG r: TGAATTCITCITTTGAAATCAG	173	Jackson vd. 2004a
<i>E. hirae</i>	f: CTTTCIGATATGGATGCTGTC r: TAAATTCTTCCITAAATGTTG	187	Jackson vd. 2004a
<i>E. mundtii</i>	f: CAGACATGGATGCTATTCATCT r: GCCATGATTTCCAGAAGAAT	98	Jackson vd. 2004a
16S rRNA	f: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG r: CCGTCAATTCCTTGTAGTTT	921	Edwards vd. 1989

Antibiyotik direnç

YSAD *Enterococcus* suşlarının antibiyotik direnç profilleri Oxoid Ltd. Şti. (İngiltere)'den temin edilen ampicilin (10 µg), doksisisiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (120 µg), kloramfenikol (30 µg), levofloksasin (5 µg), linezolid (30 µg), minosiklin (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloksasin (10 µg), penisilin G (10 U), quinupristin/dalfopristin (15 µg), rifampin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), streptomisin (300 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg) ve vankomisin (30 µg) içeren antibiyotik diskleri kullanılarak disk difüzyon

yöntemi ile belirlenmiştir (Cariolato vd., 2008). Enterokok suşlarının antibiyotik direnci ve duyarlılığı Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2016 yılı kılavuzuna göre değerlendirilmiştir.

Gentamisin ve streptomisin MİK değerlerinin belirlenmesi

İzolatların streptomisin ve gentamisin MİK değerleri 96 kuyucuklu steril polistiren mikrotitre tabaklar (LP Italiano L120138, İtalya) kullanılarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Gentamisin ve streptomisin konsantrasyonu 0.125-4096 µg/mL aralığında dilüe edilmiştir. Denemelerde antibiyotik ilave edilmemiş kuyu kontrol olarak kullanılmıştır. MİK testinde *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* ATCC 51559 ve *E. faecalis* ATCC 51299 suşları referans kültür olarak kullanılmıştır. Enterokok suşlarının MİK değerleri CLSI'nin 2016 ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi'nin (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) 2018 yılı kılavuzlarına göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

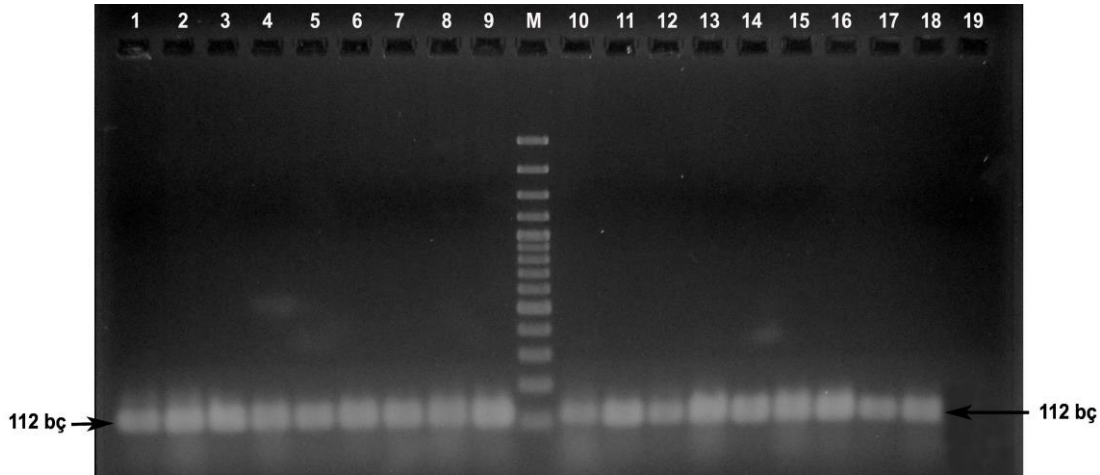
Çalışma kapsamında 112 piliç eti örneğinden toplam 36 YSAD suşu izole edilmiştir. İzolatların 10'u gentamisin (500 µg/mL) ve 26'sı ise streptomisin (2000 µg/mL) içeren besiyeri ortamlarından izole edilmiştir. İzolatların cins düzeyinde tanısı klasik metotlar (Gram boyama, katalaz testi ve kültürel testler) ve *Enterococcus* cinsine özgü primer çifti kullanılarak PZR ile yapılmıştır. Gram boyama sonrası 32 izolatın Gram pozitif kok (monokok, dipkok ve kısa zincir), 2 izolatın Gram negatif kok/kokobasil, 1 izolatın Gram pozitif basil, 1 izolatın ise Gram negatif basil morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir. Gram boyama sonucu Gram negatif (3 izolat) ve Gram pozitif basil morfolojisinde (1 izolat) olduğu tespit edilen izolatlar *Enterococcus* cinsi üyesi olmadığı düşünülerek elimine edilmiştir. Çalışmaya Gram pozitif kok morfolojisine sahip 32 izolat (7 YSGD ve 25 YSSD) ile devam edilmiştir. Katalaz testi ile 32 YSAD izolatının tamamının katalaz negatif özellik gösterdiği belirlenmiştir. YSAD izolatlarının 10°C, 37°C ve 45°C inkübasyon sıcaklığında, pH'sı 9.6'ya ayarlanmış ve % 6.5 NaCl içeren MRS broth besiyeri ortamlarında gelişme gösterebildiği belirlenmiştir. MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1 kodlu izolatlar % 6.5 NaCl içeren MRS broth ortamında zayıf gelişme göstermiştir. İzolatların tamamının 60°C'de 30 dakika sıcaklık uygulamasına dirençli olduğu belirlenmiştir. Klasik tanı yöntemlerinden elde edilen bilgiler ışığında piliç eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD izolatı *Enterococcus* cinsi üyesi olarak tanımlanmıştır. İzolatların cins düzeyinde tanısı *Enterococcus* cinsine özgü primerler çiftinin

kullanıldığı PZR işlemi ile doğrulanmıştır. PZR denemesi sonucu 32 YSAD izolatın tamamının *Enterococcus* cinsine özgü primerler ile beklenildiği gibi 112 kb büyüklüğünde fragmentler verdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Bu sonuçlar klasik tanı testi sonuçlarını desteklemiş ve YSAD izolatların tamamının *Enterococcus* cinsi üyesi olduğu doğrulanmıştır. Gentamisin içeren MRS agar ortamından izole edilen suşlara MGM, Enterococcosel agar ortamından izole edilenlere ise MGE kodu verilmiştir. Benzer olarak streptomisin içeren MRS agar ortamından izole edilen suşlara MSM, Enterococcosel agar ortamından izole edilenlere ise MSE kodu verilmiştir. Enterokoklar kanatlılarda bulunabilen ve dünya genelinde yayılım gösteren bakterilerdir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da piliç eti örneklerinden enterokok cinsi üyesi suşların izole edildiği rapor edilmiştir (Bakarata vd., 2000; Harada vd., 2004; Klibi vd., 2015; Kim vd., 2018; Sanlibaba vd., 2018). Ayrıca piliç etinden izole edilen *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı bazı çalışmalarda da YSAD *Enterococcus* suşlarının varlığı bildirilmiştir (Donabedian vd., 2003; Kim vd., 2018; Sanlibaba vd., 2018).

YSAD *Enterococcus* izolatlarının tür düzeyinde tanısı türe özgü primer çiftleri kullanılarak PZR ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan primer çiftleri ile amplifikasyon vermeyen 3 izolatın tanısı ise 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. Türe özgü primer çiftleri kullanılarak yapılan tür düzeyinde tanı testleri sonucu 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'i *E. faecium*, 5'i *E. faecalis*, 5'i *E. durans*, 1'i *E. casseliflavus* olarak tanımlanmıştır. MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1 kodlu izolatlar ise tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Bu izolatların tür düzeyinde tanısı 16S rDNA dizi analizi ile yapılmıştır. 16S rDNA dizi analizi sonucu MSE63.1, MSE63.2 ve MSE111.1 kodlu izolatların *E. avium* genomu ile % 99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'i *E. faecium* (% 56.25), 5'i *E. faecalis* (% 15.63), 5'i *E. durans* (% 15.63), 3'ü *E. avium* (% 9.37) ve 1'i *E. casseliflavus* (% 3.12) olarak tanımlanmıştır. YSAD *Enterococcus* türleri arasında baskın türün *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar

YSAD *Enterococcus* izolasyonu yapılması amaçlanmamış olsa da bu çalışmadan elde edilen sonuçlara benzer olarak Kasımoğlu-Doğru vd. (2010) tavuk boyun derisinden, Sanlibaba vd. (2018) ise paketlenmiş piliç eti örneklerinden izole edilen *Enterococcus* türleri arasında *E. faecium*'un dominant tür olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca farklı araştırmacılar tarafından yapılan

çalışmalarda da *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerine kıyasla daha az sıklıkla da olsa *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* ve/veya *E. avium* türlerine de rastlandığı bildirilmiştir (Franz vd., 1999; Bakarar vd., 2000; Butaye vd., 2001; Kasımoğlu-Doğru vd. 2010; Klibi vd., 2015; Sanlibaba vd., 2018; Kim vd., 2018).



Şekil 1. YSAD izolatlarının *Enterococcus* cinsine özgü primerler ile çoğaltılan PZR fragmentleri 1-17: YSAD izolatları; M: O'Gene Ruler DNA 100 bç DNA marker (Thermo); 18: *E. faecalis* ATCC 29212 (pozitif kontrol) ; 19: negatif kontrol (su)

Figure 1. PCR fragments of HLAR isolates amplified with *Enterococcus* genus specific primers 1-17: HLAR isolates; M: O'Gene Ruler 100 bp DNA marker (Thermo); 18: *E. faecalis* ATCC 29212 (positive control) ; 19: negative control (water)

Piliç eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* türlerinin dağılımı Çizelge 2'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara benzer olarak piliç eti ve tavuk ile ilişkili örneklerden (dışkı, kör bağırsak veya boyun derisi) izole edilen *Enterococcus* türlerinin antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da YSAD *E. faecium* (Yoshimura vd., 2000; Harada vd., 2004; Jackson vd., 2004b; Petsaris vd., 2005; Diarra vd., 2010; Kasımoğlu-Doğru vd. 2010; Sanlibaba vd., 2018), *E. faecalis* (Yoshimura vd., 2000; Harada vd., 2004; Jackson vd., 2004b; Diarra vd., 2010; Kasımoğlu-Doğru vd. 2010; Choi ve Woo, 2013; Sanlibaba vd., 2018), *E. durans* (Jackson vd., 2004b), *E. gallinarum* (Harada vd., 2004; Jackson vd., 2004b) ve *E. hirae* (Jackson vd., 2004b; Diarra vd., 2010) türlerine rastlandığı bildirilmiştir.

Disk difüzyon testi sonucu piliç eti örneklerinden izole edilen 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 4 ile 16 arasında değişen sayıda antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlenmiştir. İzolatlar arasından en geniş antibiyotik direnç profiline sahip izolatın *E. faecalis* MSM93.1 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). İzolatların tamamının (% 100) çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlenmiştir. Geçmiş yıllarda piliç eti veya tavuk ile ilişkili örneklerden (dışkı ve kör bağırsak) izole edilen enterokokların antibiyotik direnç profillerinin araştırıldığı çalışmalarda da enterokok izolatlarının çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Diarra vd., 2010; Kim vd., 2018; Sanlibaba vd., 2018).

Çizelge 2. Piliç eti örneklerinden izole edilen YSAD* *Enterococcus* türlerinin dağılımı
 Table 2. Distribution of HLAR* *Enterococcus* species isolated from broiler meat samples

<i>Enterococcus</i> türü <i>Enterococcus</i> species	Piliç eti örnekleri/ Broiler meat samples (n= 112)			
	Baget/Drumstick (n=16)	But/Leg (n=20)	Göğüs/Breast (n= 37)	Kanat/Wings (n= 39)
	YSGD/YSSD** HLGR/HLSR**	YSGD/YSSD HLGR/HLSR	YSGD/YSSD HLGR/HLSR	YSGD/YSSD HLGR/HLSR
<i>E. faecium</i> (n= 18)	0/1	0/7	0/4	0/6
<i>E. faecalis</i> (n= 5)	0/1	0/1	1/1	0/1
<i>E. durans</i> (n= 5)	0/0	0/0	4/0	1/0
<i>E. avium</i> (n= 3)	0/0	0/0	0/0	0/3
<i>E. casseliflavus</i> (n= 1)	0/0	0/0	0/0	1/0
Toplam/Total	0/2	0/8	5/5	2/10

*YSAD: Yüksek seviyede aminoglikozid dirençli/HLAR: High-level aminoglycoside-resistant

** YSGD: Yüksek seviyede gentamisin dirençli/HLGR: High-level gentamicin-resistant; YSSD: Yüksek seviyede streptomisin dirençli/HLSR: High-level streptomycin-resistant

YSAD izolatların en duyarlı olduğu antibiyotiklerin ampisilin (%93.75), linezolid (%93.75), penisilin G (%90.62), teikoplanin (%90.62), nitrofurantoin (%78.12), vankomisin (%75) ve kloramfenikol (%68.75) olduğu tespit edilmiştir. Eritromisin dışında izolatların denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere ise farklı oranda duyarlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4). Elde edilen bu bulgulara benzer olarak El-Ghazawy vd. (2016), YSAD klinik *Enterococcus* izolatlarının linezolide (%97.9), teikoplanine (%93.7) ve vankomisine (%93.7) yüksek oranda duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. YSAD *Enterococcus* izolatlarının en dirençli olduğu antibiyotiklerin eritromisin (%96.87), minosiklin (%96.87), streptomisin (%96.87) ve tetrasiklin (%96.87) olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak Mendiratta vd. (2008), YSAD klinik *Enterococcus* izolatlarında yüksek oranda eritromisin ve tetrasiklin direnci tespit etmişlerdir. Bu bulgulara ilaveten izolatların siprofloksasin, kloramfenikol ve rifampisin direnç oranları da bu çalışmadan elde edilen bulgulara benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan, araştırmacılar bizim bulgularımızın aksine izolatların ampisiline ve penisiline yüksek oranda direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir. El-Ghazawy vd. (2016), YSAD klinik *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik direnç profillerini araştırdıkları çalışmalarında bizim bulgularımıza benzer olarak yüksek oranda (%78.7) eritromisin

direnci tespit etmişlerdir. Ancak araştırmacılar YSAD klinik *Enterococcus* suşlarında bizim bulgularımıza kıyasla daha yüksek oranda ampisilin (% 40.4) ve penisilin (% 46.8) direnci tespit ettiklerini rapor etmişlerdir.

Piliç eti örneklerinden izole edilen YSAD *Enterococcus* türlerinin antibiyotik duyarlılık ve direnç yüzdeleri Çizelge 5'de verilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* türü üyesi izolatların antibiyotik direnç profillerinin diğer izolatlara nazaran daha geniş olduğu tespit edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarının linezolid hariç, *E. faecium* izolatlarının ise linezolid, teikoplanin ve vankomisin hariç denemelerde kullanılan diğer antibiyotiklere direnç gösteren izolatlarının olduğu belirlenmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda *Enterococcus* türlerinin antibiyotik dirençlerinin izolasyon kaynağına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak, yapılan çalışmalar *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin diğer türlere nazan daha geniş antibiyotik direncine sahip olduğunu göstermiştir (Chajacka-Wierzchowska vd., 2012; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Russo vd., 2018).

Çizelge 3. YSAD *Enterococcus* suşlarının antibiyotik direnç profilleri ve gentemisin ve streptomisin MİK değerleri

Table 3. Antibiotic resistance profiles and gentamicin and streptomycin MIC values of HLA^R *Enterococcus* strains

Suşlar Strains	Antibiyotik direnç* Antibiotic resistance	MİK (µg/mL)** MIC (µg/mL)	
		CN	S
<i>E. durans</i> MGE13.1	DO, E, CN, QD, MH, F, S, TE	>4096 ^R	4096 ^R
<i>E. durans</i> MGE13.2	E, CN, QD, MH, F, S, TE	4096 ^R	4096 ^R
<i>E. durans</i> MGE13.3	E, CN, QD, MH, F, S, TE	>4096 ^R	2048 ^R
<i>E. durans</i> MGE13.4	E, CN, QD, MH, F, S, TE	>4096 ^R	2048 ^R
<i>E. faecium</i> MSM14.1	DO, E, CN, LEV, MH, RD, S, TE	4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSE31.1	DO, E, CN, MH, F, NOR, P, S, TE	1024 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSE53.1	DO, E, CN, C, MH, S, TE	4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecalis</i> MSM53.1	DO, E, CN, LEV, QD, MH, NOR, CIP, S, TE	4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSE58.1	DO, E, CN, C, LEV, MH, NOR, CIP, S, TE	>4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecalis</i> MGE58.1	DO, E, CN, C, MH, NOR, P, CIP, S, TE	>4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecalis</i> MSE61.1	DO, E, CN, QD, MH, S, TE	>4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. durans</i> MGE63.1	E, CN, C, QD, S,	>4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. avium</i> MSE63.1	E, CN, C, LEV, QD, MH, F, NOR, CIP, S, TE	4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. avium</i> MSE63.2	CN, MH, S, TE	2048 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM76.1	DO, E, LEV, MH, NOR, CIP, S, TE	32	>4096 ^R
<i>E. faecalis</i> MSM 93.1	AMP, DO, E, C, LEV, LZD, QD, MH, NOR, P, RD, CIP, S, TEC, TE, VA	128	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM95.1	DO, E, LEV, MH, CP, S, TE	32	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM103.1	AMP, DO, E, MH, RD, S, TE	64	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM104.1	DO, E, MH, S, TE	64	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSE104.1	DO, E, CN, LEV, MH, S, TE	>4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSE104.2	DO, E, CN, LEV, MH, NOR, CIP, S, TE	>4096 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM105.1	DO, E, QD, MH, CIP, S, TE	64	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM106.1	DO, E, MH, RD, S, TE	64	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM107.1	DO, E, MH, CIP, S, TE	32	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM108.1	DO, E, MH, S, TE	32	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM109.1	DO, E, MH, RD, S, TE	32	>4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSM110.1	DO, E, MH, NOR, RD, CIP, S, TE	32	>4096 ^R
<i>E. casseliflavus</i> MGM111.1	E, CN, C, MH, TE	4096 ^R	64
<i>E. avium</i> MSE111.1	E, CN, MH, S, TE	512 ^R	4096 ^R
<i>E. faecium</i> MSE111.2	E, LEV, QD, MH, S, TE	256 ^R	>4096 ^R
<i>E. faecalis</i> MSM112.1	DO, E, QD, MH, NOR, CIP, S, TE	16	2048 ^R
<i>E. faecium</i> MSM112.2	DO, E, LEV, MH, RD, CIP, S, TE	64	>4096 ^R

*AMP: Ampisilin/*Ampicilin* (10 µg); DO: Doksisisiklin/*Doxycycline* (30 µg); E: Eritromisin/*Erytromycin* (15 µg); CN: Gentamisin/*Gentamicin* (120 µg); C: Kloramfenikol/*Chloramphenicol* (30 µg); LEV: Levofloksasin/*Levofloxacin* (5 µg); LZD: Linezolid/*Linezolid* (30 µg); MH: Minosiklin/*Minocycline* (30 µg); F: Nitrofurantoin/*Nitrofurantoin* (300 µg); NOR: Norfloksasin/*Norfloxacin* (10 µg); P: Penisilin G/*Penicillin G* (10 U); QD: Quinupristin/dalfopristin/*Quinupristin/dalfopristin* (15 µg); RD: Rifampin/*Rifampin* (5 µg); CIP: Siprofloksasin/*Ciprofloxacin* (5 µg); S: Streptomisin/*Streptomycin* (300 µg); TEC: Teikoplanin/*Teicoplanin* (30 µg); TE: Tetrasiklin/*Tetracycline* (30 µg); VA: Vankomisin/*Vancomycin* (30 µg)

** R: Dirençli/*Resistant*. EUCAST kırılma noktaları tablolarına (2018) göre gentamisin ve streptomisin MİK sınırları değerleri sırasıyla >128 ve >512 µg/mL olarak alınmıştır. According to the EUCAST breakpoints tables (2018), gentamicin and streptomycin MIC breakpoints are >128 and >512 µg/mL, respectively.

Çizelge 4. YSAD *Enterococcus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri (%)
 Table 4. Antibiotic resistance and susceptibility rates of HLAAR *Enterococcus* isolates (%)

Antibiyotikler/ <i>Antibiotics</i>	S*		I		R	
	<i>n</i> **	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Ampisilin/ <i>Ampicilin</i>	30	93.75	0	0	2	6.25
Doksisiklin/ <i>Doxycycline</i>	1	3.13	8	25	23	71.87
Eritromisin/ <i>Erythromycin</i>	0	0	1	3.13	31	96.87
Gentamisin/ <i>Gentamicin</i>	14	43.75	0	0	18	56.25
Kloramfenikol/ <i>Chloramphenicol</i>	22	68.75	3	9.37	7	21.88
Levofloksasin/ <i>Levofloxacin</i>	14	43.75	7	21.87	11	34.38
Linezolid/ <i>Linezolid</i>	30	93.75	1	3.13	1	3.12
Minosiklin/ <i>Minocycline</i>	1	3.13	0	0	31	96.87
Nitrofurantoin/ <i>Nitrofurantoin</i>	25	78.12	1	3.13	6	18.75
Norfloksasin/ <i>Norfloxacin</i>	9	28.13	13	40.62	10	31.25
Penisilin G/ <i>Penicillin G</i>	29	90.63	0	0	3	9.37
Quinupristin/dalfopristin <i>Quinupristin/dalfopristin</i>	5	15.63	15	46.87	12	37.50
Rifampin/ <i>Rifampin</i>	15	46.87	10	31.25	7	21.88
Siprofloksasin/ <i>Ciprofloxacin</i>	5	15.63	13	40.62	14	43.75
Streptomisin/ <i>Streptomycin</i>	1	3.13	0	0	31	96.87
Teikoplanin/ <i>Teicoplanin</i>	29	90.62	2	6.25	1	3.13
Tetrasiklin/ <i>Tetracycline</i>	1	3.13	0	0	31	96.87
Vankomisin/ <i>Vancomycin</i>	24	75	7	21.87	1	3.13

* S: Duyarlı/*Susceptible*; I: Orta seviyede dirençli/*Intermediary*; R: Dirençli/*Resistant*

**n: izolat sayısı / *number of isolate*

YSAD *Enterococcus* izolatlarının gentamisin ve streptomisin MİK değerleri Çizelge 3'de verilmiştir. İzolatların gentamisin MİK değerlerinin 16 ile >4096 µg/mL ve streptomisin MİK değerlerinin ise 64 ile >4096 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. MİK testi sonucu YSSD izolatlarının tamamı streptomisine, YSGD izolatlarının tamamı ise gentamisine dirençli bulunmuştur. Aynı zamanda YSSD izolatlarının %56'sının gentamisine ve YSGD izolatlarının ise %85.71'inin streptomisine karşı yüksek seviyede dirence sahip olduğu belirlenmiştir. 32 YSAD *Enterococcus* izolatının 18'inin (%56.25) hem YSSD hem de YSGD oldukları tespit edilmiştir. Jackson vd. (2004b), kümes hayvanları karkaslarından izole ettikleri enterokoklardan, 37 izolatın (% 23) gentamisine (MİK> 500 µg/mL), 31 izolatın streptomisine (% 19) (MİK> 1000 µg/mL) dirençli olduğunu saptamışlardır. Harada vd. (2004), piliç eti örneklerinden izole ettikleri 19

suşun gentamisin MİK değerlerinin 256-2048 µg/mL arasında olduğunu bildirmişlerdir. Petsaris vd. (2005), tavuk kör bağırsak örneklerinden izole ettikleri 90 *E. faecium* izolatından 3'ünün yüksek gentamisin direncine sahip olduğunu (MİK> 512 µg/mL) bulmuşlardır. Diarra vd. (2010), tavuk dışkı ve kör bağırsak örneklerinden izole ettikleri 69 enterokok izolatının MİK değerlerinin gentamisin için 128-512 µg/mL, streptomisin için ise 512-2048 µg/mL arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Choi ve Woo (2013), Kore'de yaptıkları çalışmada 2003 ve 2010 yılları arasında toplanan perakende piliç eti örneklerinden izole edilmiş 101 *E. faecalis* izolatının 11'inin gentamisine yüksek seviyede direnç (MİK> 2048 µg/mL) gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çizelge 5. YSAD *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium* ve *E. casseliflavus* suşlarının antibiyotik duyarlılık ve dirençlilik yüzdeleri (%)

Table 5. Antibiotic resistance and susceptibility rates of HLAR *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium* and *E. casseliflavus* isolates (%)

Antibiyotikler Antibiotics	<i>E. faecium</i> (n: 18)			<i>E. faecalis</i> (n: 5)			<i>E. durans</i> (n: 5)			<i>E. avium</i> (n: 3)			<i>E. casseliflavus</i> (n: 1)		
	S*	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ampisilin <i>Ampicilin</i>	94.44	0	5.56	80	0	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Doksisiklin <i>Doxycycline</i>	0	5.56	94.44	0	0	100	20	60	20	0	100	0	0	100	0
Eritromisin <i>Erytromycin</i>	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	33.33	66.67	0	0	100
Kloramfenikol <i>Chloramphenicol</i>	11.11	11.11	77.78	40	0	60	80	0	20	33.33	0	66.67	0	0	100
Gentamisin <i>Gentamicin</i>	55.56	0	44.44	20	0	80	0	0	100	0	0	100	0	0	100
Levofloksasin <i>Levofloxacin</i>	27.78	27.78	44.44	20	40	40	100	0	0	66.67	0	33.33	100	0	0
Linezolid <i>Linezolid</i>	100	0	0	60	20	20	100	0	0	0	0	100	100	0	0
Minosiklin <i>Minocycline</i>	0	0	100	0	0	100	20	0	80	0	0	100	0	0	100
Nitrofurantoin <i>Nitrofurantoin</i>	88.88	5.56	5.56	100	0	0	20	0	80	66.67	0	33.33	100	0	0
Norfloksasin <i>Norfloxacin</i>	11.11	61.11	27.78	0	20	80	80	20	0	66.67	0	33.33	100	0	0
Penisilin G <i>Penicillin G</i>	94.44	0	5.56	60	0	40	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Quinupristin/dalfopristin <i>Quinupristin/ dalfopristin</i>	16.67	72.12	11.11	0	20	80	0	0	100	33.33	33.33	33.33	100	0	0
Rifampin <i>Rifampin</i>	16.67	50	33.33	60	20	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Siprofloksasin <i>Ciprofloxacin</i>	0	50	50	20	0	100	20	80	0	66.67	0	33.33	100	0	0
Streptomisin <i>Streptomycin</i>	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	0	0
Teikoplanin <i>Teicoplanin</i>	94.44	5.56	0	60	20	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0
Tetrasiklin <i>Tetracycline</i>	0	0	100	0	0	100	20	0	80	0	0	100	0	0	100
Vankomisin <i>Vancomycin</i>	61.11	38.89	0	80	0	20	100	0	0	100	0	0	100	0	0

*n: izolat sayısı / number of isolate

** S: Duyarlı / Susceptible; I: Orta seviyede dirençli / Intermediary; R: Dirençli / Resistant

SONUÇ

Enterokokların antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç bu bakterilerin patojenitesine katkıda bulunan faktörlerin başında gelmektedir. Antibiyotik direncin yaygınlaşması global düzeyde endişe uyandırmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar, hayvan yetiştiriciliğinde terapötik ve terapötik olmayan amaçlarla kullanılabilir. Kommensal ve patojen bakterilerde antibiyotik direncin artışıdaki temel unsurların başında klinik öneme sahip antibiyotiklerin hayvan yetiştiriciliğinde bilinçsiz ve kontrolsüz olarak kullanımı gelmektedir. Aminoglikozitler yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir. Bakterilerde yüksek seviyede aminoglikozit direncinin yaygınlaşması enfeksiyonların tedavisinde sorunlara yol açma

riskini beraberinde getirmektedir. Çalışma kapsamında piliç eti örneklerinden YSAD *Enterococcus* suşlarının izole edilmesi ve izolatların tamamının çoklu antibiyotik direnç özelliği göstermesi bu suşların antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında rezervuar görevi görebilmesi nedeniyle endişe uyandırıcıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 5010-YL1-17 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

YT, çalışma konusunu belirlemiş ve deneysel çalışma düzenineğini planlamıştır. MY ve YT deneysel çalışmaları gerçekleştirmiştir. MY makalenin taslağını oluşturmuş, YT makalenin son halini almasını sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

KAYNAKLAR

Abauelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M. (2016). Evaluation of the extent of virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from fermented and unfermented foods. *Ann Microbiol*, 66: 577-585.

Barakat, R.K., Griffiths, M.W., Harris, L.J. (2000). Isolation and characterisation of *Carnobacterium*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packed, refrigerated, poultry meat. *Int J Food Microbiol*, 62(1-2): 83-94.

Bismuth, R., Courvalin, P. (2010). Aminoglycosides and Gram-positive bacteria: antibiogram, 3rd edn. ESKA, Portland

Butaye, P., Devriese, L.A., Haesebrouck, F. (2001). Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(5): 1374-1378.

Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58(5): 1772-1775.

Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19(9): 886-892.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Laniewska-Trokenheim, L. (2012). Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in ready-to-eat food of animal origin. *Afr J Microbiol Res*, 6(39): 6773-6780.

Choi, J-M., Woo, G-J. (2013). Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *Int J Food Microbiol*, 165(1): 1-6.

Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI 2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S26 CLSI, Wayne, PA.

Demirgöl, F., Tücer, Y. (2017). Detection of antibiotic resistance and resistance genes in enterococci isolated from sucuk, a traditional Turkish dry fermented sausage. *Korean J Food Sci An*, 37: 670-681.

Devriese, L.A., Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. (eds.), Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 327-367.

Diarra, M.S., Rempel, H., Champagne, J., Masson, L., Pritchard, J., Edward, T. (2010). Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 76(24): 8033-8043.

Donabedian, S.M., Thal, L.A., Hershberger, E., Perri, M.B., Chow, J.W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce, K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Mackinson, C., Debess, E., Madden, J., Angulo, F., Zervos, M.J. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant *enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol*, 41(3): 1109-1113.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl Acids Res*, 17: 7843-7853.

El-Ghazawy, I.F., Okasha, H.A.S., Mazloum, S.M. (2016). A study of high level aminoglycoside resistant enterococci. *Afr J Microbiol Res*, 10(16): 572-577.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, (EUCAST 2018).

- Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 8.0, valid from 2018-01-01.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H., Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroad of food safety. *Int J Food Microbiol*, 47(1-2): 1-24.
- Garrido, A.M., Galvez, A., Pulido, R.P. (2014). Antimicrobial resistance in enterococci. *J Infect Dis Ther*, 2: 150.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from food. *FEMS Microbiol Rev*, 26: 163-171.
- Hanchi, H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front Microbiol*, 9: 1791.
- Harada, T., Mito, Y., Otsuki, K., Murase, T. (2004). Resistance to gentamicin and vancomycin in enterococcal strains isolated from retail broiler chickens in Japan. *J Food Prot*, 67(10): 2292-2295.
- Hugas, M., Garigga, M., Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *Int J Food Microbiol*, 88(2-3): 223-233.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B. (2004a). Use of the genus and species specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J Clin Microbiol*, 42(8): 3558-3565.
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B., Ladely, S.D. (2004b). Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis*, 48(1): 100-107.
- Jackson, C.R., Lombard, J.E., Dargatz, D.A., Fedorka-Cray, P.J. (2011). Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *Lett Appl Microbiol*, 52(1): 41-48.
- Kasimoğlu-Doğru, A., Gencay, Y.E., Ayaz, N.D. (2010). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Res Vet Sci*, 89(2): 153-158.
- Klibi, N., Aouini, R., Borgo, F., Ben Said, L., Ferrario, C., Dziri, R., Boudabous, A., Torres, C., Ben Slama, K. (2015). Antibiotic resistance and virulence of faecal *enterococci* isolated from food-producing animals in Tunisia. *Ann Microbiol*, 65: 695-702.
- Kim, Y.-J., Park, J.-H., Seo, K.H. (2018). Comparison of the loads and antibiotic-resistance profiles of *Enterococcus* species from conventional and organic chicken carcasses in South Korea. *Poultry Science*, 97:271-278.
- Linden, P.K., Miller, C.B. (1999). Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 33(2): 113-120.
- Manero, A., Blanch, A.R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol*, 65: 4425-4430.
- Mendiratta, D.K., Kaur, H., Deotale, V., Thamke, D.C., Narang, R., Narang, P. (2008). Status of high level aminoglycoside resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in a rural hospital of central India. *Indian J Med Microbiol*, 26(4): 369-371.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from North–West Italian dairy products. *Int Dairy J*, 16: 867-875.
- Niu H., Yu H., Hu T., Tian G., Zhang L., Guo X., Hu H., Wang Z. (2016). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Braz J Microbiol*, 47: 691-696.
- Özdemir, R., Tuncer, Y. (2020). Detection of antibiotic resistance profiles and aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes in high-level aminoglycoside-resistant (HLAR) enterococci isolated from raw milk and traditional cheeses in Turkey. *Mol Biol Rep*, 47:1703-1712.
- Özden, Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y. (2013). Occurrence of enterocin genes, virulence factors,

- and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Turk J Biol*, 37: 443-449.
- Petsaris, O., Miszczak, F., Gicquel-Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Humbert, F., Sanders, P., Leclercq, R. (2005). Combined antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolated from chickens. *Appl Environ Microbiol*, 71(5): 2796-2799.
- Ramirez, M., Tolmasky M. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13(6): 151-171.
- Russo, N., Caggia, C., Pino, A., Teresa, M.C., Arioli, S., Randazzo, C.L. (2018). *Enterococcus* spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: A snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food Chem Toxicol*, 120: 277-286.
- Sahoo, T.K., Jena P.K., Nagar N., Patel A.K., Seshadri S. (2015). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*. *Probiotics & Antimicro Prot*, 7: 126-136.
- Sanlibaba, P., Tezel B.U., Senturk E. (2018). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from chicken in Turkey. *Korean J Food Sci An*, 38(2): 391-402.
- Temiz, A. (1994). *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Şafak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 266 s. ISBN:975-95834-0-2
- Yao, J.D.C., Moellering, R.C. (2007). Antibacterial agent, In: *Manual of Clinical Microbiology*, Murray, P.R. (chief ed), ASM, Washington DC, 1077-1113.
- Yogurtcu, N.N., Tuncer, Y. (2013). Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Int J Dairy Technol*, 66: 236-242.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S., Kojima, A. (2000). Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broiler and layer chickens. *Lett Appl Microbiol*, 31(6): 427-432.