

KISA BİLDİRİ:
BESİCİ VE SIĞIRLARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK TÜRLERİNİN
DAĞILIMI VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

SHORT COMMUNICATION:
 SPECIES DISTRIBUTION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF ENTEROCOCCI
 ISOLATED FROM CATTLE FARMERS AND CATTLES

Ergun METE*, İlknur KALELİ*

ÖZET: Bu çalışmanın amacı, Denizli ve çevresinde besici ve sığırlardan alınan rektal sürüntü ve dışkı örneklerinden izole edilen enterokoklarda tür dağılımının ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi ve vankomisine direnç varlığının araştırılmasıdır. Tüm örnekler vankomisin içeren (6 µg/ml) ve içermeyen Enterococcosel agar (ECA) ve Enterococcosel sıvı besiyerine (ECB) ekilmiş ve kültürler 37°C'de ECA için 24 saat, ECB için 48 saat inkübe edilmiştir. Çalışmaya alınan 111 besicinin 96'sından (%86.4) ve 72 sığırın 65'inden (%90.2) enterokok türleri izole edilmiştir. Hem insan hem de hayvanlardan en sık izole edilen türler *E.faecalis* (sırasıyla, %39.6 ve %32.3), *E.faecium* (sırasıyla, %28.1 ve %24.6) ve *E.raffinosis* (sırasıyla, %8.3 ve %13.8) olup ilk üç sırayı almışlardır. İzolatların hiçbirisinde vankomisin ve teikoplanin direnci saptanmamıştır. Besicilerden yüksek düzey streptomisine (300 µg) dirençli bir *E.faecium* suşu, sığırlardan ise yüksek düzey gentamisine (120 µg) dirençli altı suş (2 *E.faecalis*, 2 *E.durans*, 2 *E.hirae*) izole edilmiştir. *Enterococcus spp.* izolasyonu açısından rektal sürüntü ve dışkı örnekleri arasında anlamlı bir fark bulunmamış ($p>0.05$), buna karşın ECB besiyeri *Enterococcus spp.* izolasyonu için ECA besiyerine göre daha duyarlı bulunmuştur ($p=0.001$). Bu çalışmada vankomisine dirençli enterokok izole edilememesinin nedeninin, ülkemizde avoparsin kullanımının yasaklanmış olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Enterokok, besici, sığır, antimikrobiyal direnç.

ABSTRACT: The aim of this study was to detect the species distribution and antibiotic resistance of enterococci with a special view for vancomycin resistance, isolated from stool and rectal swab samples of cattle farmers and cattles in Denizli region, Turkey. All the specimens were inoculated onto Enterococcosel agar plate and into Enterococcosel broth supplemented with and without vancomycin (6 µg/ml). The agar plates were incubated at 37°C for 24 hours, while broth cultures were incubated at 37°C for 48 hours. *Enterococcus*

* Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

spp. were isolated from 96 (86.4%) of 111 farmers' and 65 (90.2%) of 72 cattles' specimens. The most commonly isolated species from both humans and animals were *E.faecalis* (39.6% and %32.3%, respectively), *E.faecium* (28.1% and 24.6%, respectively) and *E.raffinosis* (8.3% and 13.8%, respectively). None of the isolates were found to be resistant to vancomycin and teicoplanin. One high-level streptomycin (300 µg) resistant *E.faecium*, and six (2 *E.faecalis*, 2 *E.durans*, 2 *E.hirae*) high-level gentamicin (120 µg) resistant strains have been isolated from the specimens of cattle farmers and cattles, respectively. There was no significant difference between the rectal swabs and stool specimens for the isolation of *Enterococcus spp.* ($p>0.05$). Enterococcosel broth was found to be more sensitive than Enterococcosel agar for the isolation of *Enterococcus spp.* ($p=0.001$). It was concluded that the lack of vancomycin resistant enterococci may be related to the prohibition of avoparcin use in our country.

Key words: Enterococcus, cattle, farmer, antimicrobial resistance.

G İ R İ Ő

Enterokoklar insanda önemli nozokomiyal patojenlerdir. Vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) ilk olarak 1986 yılında Avrupa'da ve 1987 yılında da ABD'de izole edilmişlerdir. O zamandan beri çeşitli ülkelerde VRE rapor edilmektedir¹⁻³. Avrupa'daki toplumlarda VRE'nin fekal taşıyıcılık oranı ABD'den daha yüksektir^{4,5}. Özellikle Avrupa'da çeşitli hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak bir glikopeptid olan avoparsin'in kullanımı, VRE suşlarının besin zinciri yoluyla hayvanlardan insanlara yayılmasına yol açmıştır³⁻⁵. Türkiye'de ise avoparsin içeren yem katkı maddelerinin ithali ve kullanımı 30 Haziran 1999 tarihinde Tarım ve Köyşleri Bakanlığı'nın bir tebliği ile yasaklanmıştır⁶. Ülkemizde yasağın başladığı tarihten önce besici ve hayvanlarda vankomisin direncini araştıran bir çalışmaya ulaşılabilen kaynaklarda rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, besicilerden ve siğırlardan izole edilen enterokoklarda vankomisin direncinin varlığı, enterokok suşlarının dağılımı, suşların katı ve sıvı besiyerlerindeki üremelerinin değerlendirilmesi ve diğer antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 111 besici (siğır yetiştiricisi) ve 72 siğırdan alınan dışkı ve rektal sürüntü örnekleri dahil edildi. Rektal sürüntü örnekleri 1 ml %0.9 NaCl ile süspanse edildi, dışkı örnekleri ise %10 oranında (0.5 gr dışkı, 4.5 ml %0.9 NaCl.) dilue edildi. Tüm örnekler vankomisin içeren (6 µg/ml) ve içermeyen Enterococcosel agar (ECA) ve Enterococcosel sıvı (ECB) besiyerlerine ekildi. Vankomisinli besiyeri, VRE izolasyonunu kolaylaştırmak amacıyla kullanıldı. Ekimler 37°C'de ECA için 24 saat, ECB için 48 saat inkübe edildi. ECB inkübasyonu sonunda eskülini hidrolize ederek koyu kahverengi-siyah renk değişimi olan ve olmayan kültürlerden 0.1 ml alınarak ECA besiyerine pasajlandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Enterokokların tanımlanmasında koloni morfolojisi, koyun kanlı agardaki hemoliz karakterleri, Gram boyama, katalaz testi, %40 safralı eskülin hidrolizi, 10°C ve 45°C'de üreme özellikleri, %6.5 NaCl besiyerinde üreme yeteneğı ve PYR testleri yapıldı.

Enterokok olarak saptanan suşlar için; arginin dihidrolaz aktivitesi, mannitol, sorboz, sükröz, rafinoz, laktoz, arabinoz ve sorbitolden asit oluşturmaları, piruvat kullanımı, hareket ve pigment oluşum özelliklerine göre tür ayrımları yapıldı. İzole edilen enterokokların antibiyotik duyarlılıkları [Vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), penisilin (10 IU), gentamisin (120 µg), streptomisin (300 µg), siprofloksasin (5 µg) ve tetrasiklin (30 µg)] Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Beta-laktamaz aktiviteleri ise nitrosefin diski ile saptandı⁷.

İstatistiksel analizler, SPSS 10.0 kullanılarak χ^2 kare McNemar testiyle yapıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada besicilerin 96'sından (%86.4) ve sığırların 65'inden (%90.2) enterokok türleri izole edilmiştir (Tablo I). İzolasyon oranının ECB besiyerinde ECA besiyerine göre daha yüksek olduğu saptanmış ($p=0.001$), rektal sürüntü ve dışkı örnekleri arasında *Enterococcus spp.* izolasyon sıklığı bakımından fark bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo II). Eskülini hidrolize etmeyen ve renk değişimi olmayan ECB besiyerlerinden yapılan pasajlarda *Enterococcus spp.* ürememiştir.

Tablo I: İzole Edilen Enterokok Türlerinin Besici ve Sığırlardaki Dağılımı

<i>Enterococcus spp.</i>	Besiciler Sayı (%)	Sığırlar Sayı (%)
<i>E.faecalis</i>	38 (39.6)	21 (32.3)
<i>E.faecium</i>	27 (28.1)	16 (24.6)
<i>E.raffinosis</i>	8 (8.3)	9 (13.8)
<i>E.durans</i>	7 (7.3)	5 (7.7)
<i>E.hirae</i>	7 (7.3)	4 (6.2)
<i>E.avium</i>	5 (5.2)	4 (6.2)
<i>E.pseudoavium</i>	3 (3.1)	3 (4.6)
<i>E.dispar</i>	1 (1.0)	3 (4.6)
Toplam	96 (100)	65 (100)

Tablo II: İzole Edilen Enterokokların Besiyeri Tipi ve Örneklerle Göre Dağılımları

	Besiyeri	Besiciler Sayı (%)	Sığırlar Sayı (%)
Rektal sürüntü	ECA	61 (54.9)	34 (47.2)
	ECB	96 (86.4)	64 (88.8)
Dışkı	ECA	62 (55.8)	38 (52.8)
	ECB	96 (86.4)	65 (90.2)

Çalışmada, vankomisin ve teikoplanine dirençli enterokok suşu izole edilmemiştir. Besicilerden izole edilen suşların hepsi yüksek düzey (120 µg) gentamisine duyarlı bulunmuş, yüksek düzey (300 µg) streptomisine direnç ise sadece bir *E.faecium* suşunda (%1.04) saptanmıştır. İnsan izolatlarının 8'i (%8.3) (5 *E.faecium*, 2 *E.durans*, 1 *E.hirae*) penisiline, 3'ü (%3.1) siprofloksasine

(2 *E.faecium*, 1 *E.hirae*) ve 28'i (%29.2) (11 *E.faecalis*, 6 *E.faecium*, 3 *E.hirae*, 3 *E.pseudoavium*, 2 *E.durans*, 2 *E.raffinosis*, 1 *E.avium*) tetrasikline dirençli bulunmuştur.

Siğirlardan izole edilen 65 suşun 6'sında (%9.2) (2 *E.faecalis*, 2 *E.durans*, 2 *E.hirae*) yüksek düzey gentamisin direnci, 10'unda ise (%15.4) (3 *E.faecalis*, 4 *E.faecium*, 1 *E.raffinosis*, 1 *E.avium*, 1 *E.dispar*) siprofloksasin direnci saptanmış, siğir izolatlarının hiçbirisinde yüksek düzey streptomisin, penisilin ve tetrasiklin direnci izlenmemiştir.

TARTIŞMA

Avrupa'da VRE kolonizasyonundaki artışın, hayvanlarda gelişme ve verimi artırmak için yem katkısı olarak glikopeptid yapısındaki avoparsinin kullanılmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Avrupa'da 1997 yılına kadar Avrupa'da yoğun avoparsin kullanımı, vankomisine dirençli suşların hayvanlardan insanlara geçişine yol açmış ve kesimhane ve çiftlik çalışanlarında VRE kolonizasyonunda büyük bir artış saptanmıştır^{1,4,5,8,9}. Türkiye'de ise avoparsin içeren yem katkı maddelerinin ithali ve kullanımı 1999 yılından beri yasaktır⁶. Ancak bu tarihten önce ve sonra besici ve hayvanlarda avoparsin kullanımı ve buna bağlı vankomisin direncini araştıran çalışmalara ulaşılabilen kaynaklarda rastlanmamıştır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda en sık rastlanılan enterokok türlerinin *E.faecalis* ve *E.faecium* olduğu bildirilmektedir¹⁰⁻¹⁷. Çalışmamızda besicilerden izole edilen toplam enterokok suşlarının %39.6'sının *E.faecalis*, %28.1'inin *E.faecium* olduğu izlenmiştir. Siğirlarda ise bu oranlar sırasıyla; %32.3 ve %24.6'dır. Avrupa'da, siğirlarda enterokok tür dağılımının araştırıldığı çalışmalarda, *E.hirae* İsveç ve Danimarka'da¹⁸, *E.casseliflavus* ise Almanya¹⁹ ve Costa Rica'da²⁰ ilk sırayı almaktadır.

Çalışmamızda ECB besiyeri *Enterococcus spp.* izolasyonu için ECA besiyerine göre daha duyarlı bulunmuştur ($p=0.001$). Farklı besiyerlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, en yüksek enterokok izolasyon oranının ECB besiyeri ile sağlandığı bildirilmektedir^{21,22}. ECB besiyeri, eskülin hidrolizi temelinde çalışır. Van Horn ve arkadaşları²¹, ECB ile yalancı eskülin negatifliğine rastlanmamışlar ve 2 günlük inkübasyon sonunda eskülin negatif olan besiyerlerinin, katı plağa pasaj yapılmasına gerek olmaksızın negatif olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da, ECB besiyerleri 48 saatlik inkübasyon sonunda değerlendirilmiş ve eskülin negatif olup pasajda enterokok üremesi olan ve eskülin pozitif olup üremesi olmayan örneğe rastlanmamıştır. Rektal sürüntü ve dışkı örnekleri arasında *Enterococcus spp.* izolasyon sıklığı bakımından fark saptanmamış olması da, Weinstein ve arkadaşlarının²³ bulgularıyla uyumludur.

Besicilerden izole edilen tüm enterokok suşlarının yüksek düzey gentamisine duyarlı olduğu belirlenmiştir. Yüksek düzey streptomisine dirençli bulunan bir (%1.08) izolat vankomisin ve teikoplanine duyarlı, ancak diğer antibiyotiklere de dirençli olarak bulunmuştur. Siğirlardan izole edilen suşların %9.2'sinde ise yüksek düzey gentamisin direnci saptanmış, ancak yüksek düzey streptomisin direncine rastlanmamıştır. Ülkemizde yapılan çeşitli klinik çalışmalarda, yüksek

düzey gentamisin direnci %13-30, yüksek düzey streptomisin direnci ise %18-22 arasındaki oranlarda bildirilmektedir^{14,15,24,25}. Çalışmamızda, sığır izolatlarında %15.4 gibi yüksek bir siprofloksasin direnç oranının saptanması, hayvancılıkta terapötik amaçlı olarak enrofloksasin kullanımının yaygın olmasına bağlanabilir²⁶.

Sonuç olarak, çalışmamızda besicilerden ve sığırlardan alınan örneklerde VRE kolonizasyonuna rastlanmamış, bu durumun ülkemizde 1999 yılından beri avoparsin kullanımının yasaklanmasının bir sonucu olduğu düşünülmüş ve enterokok izolasyonu için ECA besiyerine direk ekim yerine Enterococcosel sıvı besiyerinde zenginleştirmeden sonra ekilmesinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr (eds). Streptococci, Enterococci and *Streptococcus*-like bacteria, pp: 577-677. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 1997, JB Lippincott, Philadelphia.
2. Facklam RR, Sahm DF, Teixeira LM. *Enterococcus*, pp: 297-305. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover YH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 1999, ASM Press, Washington DC.
3. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 686-707.
4. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. Am J Med 1997; 102: 284-93.
5. French GL. Enterococci and vancomycin resistance. Clin Infect Dis 1998; 7: 75-83.
6. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, 30.6.1999 tarihli tebliğ.
7. Hindler J. Antimicrobial susceptibility testing, pp: 205-54. In: Isenberg HD (ed), Essential Procedures for Clinical Microbiology. 1998, ASM Press, Washington DC.
8. Lerclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis 1997; 24: 545-56.
9. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. Clin Infect Dis 2002; 34 (Suppl 3): 93-106.
10. Ersoy Y, Sönmez E, Young HJ, Ağel E, Durmaz B. Malatya, Kayseri ve Elazığ Tıp Fakültesi Hastanelerinde izole edilen enterokok suşlarında glikopeptid direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bül 2001; 2: 197-209.
11. Ertek M, Yazgı H, Aktaş AE, Erol S, Taşyaran MA. Vankomisine dirençli enterokok araştırılması ve diğer antimikrobiyalere duyarlılıklar. İnfeksi Derg 2003; 17: 447-51.
12. Kaçmaz B, Akca G, Sultan N. Enterokokların antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. İnfeksi Derg 2004; 18: 287-92.
13. Karadenizli A, Kolaylı F. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002; 33: 212-5.
14. Çınar T, Leblebicioğlu H, Sünbül M, Eroğlu C, Esen Ş, Günaydın M. Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncinin araştırılması. Flora 1999; 4: 114-9.
15. Moaddab SR, Töreci K. Enterokok suşlarında tür tayini, vankomisin ve diğer bazı antibiyotiklere direnç aranması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2000; 30: 77-84.
16. Erbek S, Özakin C, Gedikoğlu S. Toplum ve hastane kaynaklı enterokok türlerinin dağılımı. İnfeksi Derg 2002; 16: 451-5.
17. Çaylan R, Üstünakın M, Kadimov V, Aydın K, Köksal İ. Fekal ve klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 24-8.

18. Kühn I, Iversen A, Burman LG, et al. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment – a European study. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 133-45.
19. Mac K, Wichmann-Schauer H, Peters J, Ellerbroek L. Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 305-9.
20. Bustamante W, Alpizar A, Hernandez S, et al. Predominance of vanA genotype among vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates from poultry and swine in Costa Rica. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 7414-9.
21. Van Horn KG, Gedris CA, Rodney KM. Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 924-7.
22. Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey et al. Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 751-75.
23. Weinstein JW, Tallapragada S, Farrel P, Dembry LM. Comparison of rectal and perirectal swabs for detection of colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 210-2.
24. Hoşgör M, Çavuşoğlu C, Tünger A, Özinel MA. Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci. *İnfeks Derg* 1997; 11: 7-9.
25. Ögünç D, Önküt G, Saygan MB, Çolak D, Gültekin M. Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemlerin değerlendirilmesi. *İnfeks Derg* 2001; 15: 83-6.
26. Şener S, Yıldırım M. Hayvanlarda antibiyotik kullanımı ve insan sağlığıyla ilgili sonuçları. *Ankem Derg* 2002; 16: 216-22.