

## Türkiye’de Ticari Broyler İşletmelerinden *vanA* Pozitif *Enterococcus faecium* İzolasyonu

Nilgün ÜNAL \*  Zahide DİLİK \*\* Murat YILDIRIM \*

\* Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 71451, Kırıkkale - TÜRKİYE

\*\* Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, 35010, İzmir - TÜRKİYE

**Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-267**

### Özet

Bu çalışmada, ticari broyler işletmelerinden alınan svap/sürüntü örneklerinden (400 adet) Vankomisin Rezistans/Dirençli enterokokların (VRE) varlığı ve direnci gösteren *vanA* geni araştırıldı. İncelenen örneklerden sadece 1 tanesinden VRE izole edildi ve biyokimyasal testlerle *Enterococcus faecium* olarak tanımlandı. E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) ile vankomisin antibiyotiğinin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri 256 µg/ml’den büyük olarak saptandı. Ayrıca, Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile de *vanA* geni tespit edildi.

**Anahtar sözcükler:** *Broyler, Enterococcus faecium, vanA, Vankomisin Rezistans/Dirençli Enterokok (VRE)*

## Isolation of a *vanA* Positive *Enterococcus faecium* from Commercial Broiler Farms in Turkey

### Summary

In this study, the *vanA* gene indicating Vancomisin Resistance Enterococcus (VRE) was ascertained from swab samples (n=400) collected from commercial broiler farms. VRE was isolated only from a single sample and identified as *Enterococcus faecium* by the biochemical tests. Minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin was determined as >256 µg/ml by E-test. Furthermore, the *vanA* gene was detected by PCR.

**Keywords:** *Broiler, Enterococcus faecium, vanA, Vancomycin Resistance Enterococcus (VRE)*

### GİRİŞ

Enterokoklar hem hayvanların hem de insanların bağırsak florasında bulunabilmektedirler. Kanatlı hayvanlarda septisemi, ineklerde mastitis, buzağı ve kuzularda endokarditis ve köpeklerde üriner sistem enfeksiyonları gibi fırsatçı enfeksiyonları oluşturmaktadırlar <sup>1</sup>. İnsanlarda ise endokardit dışında patojeniteleri, immün sistemleri baskılanmış insanlarla sınırlıdır <sup>2</sup>.

Enterokoklardaki glikopeptit grubu antibiyotiklere direnç *vanA/B/C/D/E/G/L* genleri ile ilişkilidir. Bugüne kadar Avrupa’da insanlardan izole edilen *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) suşlarında *vanA* ve *vanB* tipi direnç en yaygın görülen dirençtir. Ülkemizde ise hastalardan izole edilen VRE (Vankomisin Rezistans/Dirençli Entero-

koklar) kökenleri incelendiğinde *E. faecium*’un yaygın olduğu ve *vanA* geni taşıdıkları saptanmıştır <sup>3</sup>. *vanA* geni taşıyan VRE’ler yüksek düzey vankomisin direnç fenotipi, minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK)  $\geq 128$  µg/ml’dir ve 10.8 kb’lık Tn 1546 transpozonu üzerinde kodlanan genleri Metisilin Rezistans/Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi daha patojen bakterilere aktarabilmeleri bu direnci daha da önemli hale getirmektedir <sup>4,5</sup>.

Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri’nde yapılan çalışmalarda tavukların, insanlarda hastane enfeksiyonlarına sebep olan antibiyotik dirençli enterokoklar için potansiyel rezervuar olduğu ortaya konmuştur <sup>6</sup>. Hayvanlarda gelişmeyi artırmak için



İletişim (Correspondence)



+90 318 3574242



nilkarakaya@hotmail.com

yemlere katılan avoparsin isimli antibiyotik, beşeri hekimlikte MRSA ve çoğul dirençli gram pozitiflerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan vankomisin ile aynı grupta bulunmaktadır. Bundan dolayı, avoparsin ilave edilmiş rasyonlarla beslenmiş hayvanlarda ve bu hayvanlardan elde edilen gıdalardan VRE izole edilebilmektedir<sup>7</sup>. Türkiye’de avoparsinin yem katkı ve premikslerde kullanımı 1999’da, Avrupa Birliği’nde ise 1997’de yasaklanmıştır<sup>8,9</sup>.

Bu çalışmada, Ankara ve Kırıkkale’de bulunan bazı ticari broylar sürülerinde vankomisin dirençli enterokokların varlığını araştırmak ve vankomisin direnç genini belirlemek amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Bu araştırmada, 2005 yılında Ankara ve Kırıkkale’de 8.000-15.000 kapasiteli 4 ticari işletmede bulunan broylarlerden 400 kloakal sürüntü örneği alındı ve soğuk zincir içerisinde laboratuvara getirildi. Her bir kloakal sıvıya örneği 6 µg/ml vankomisin içeren “Slanetz Bartley” (Oxoid, İngiltere) agarlara ekildi ve 45°C’de 24 saat inkübe edildi. Üreyen şüpheli kolonilerin identifikasyonu, koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, “L-pyrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR)”, “Bile Aesculin” agarda siyah renk oluşumu ve %6.5 tuzlu “Brain-Heart Infuzyon” buyyonda üreme ile cins düzeyinde, arjinin dekarboksilasyonu, hareket testi, koloni pigmentasyonu, mannitol, arabinoz, rafinoz ve laktoz fermentasyon testlerine göre *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) olarak tanımlandı<sup>10</sup>. Biyokimyasal testlerin kontrolünde ATCC 29212 *E. faecalis* suşundan yararlanıldı.

*E. faecium* olarak tanımlanan izolatın penisilin (10 U), rifampin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), streptomisin (300 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (120 µg), enrofloksasin (5 µg), kuinopristin/dalfopristin (15 µg), teikoplanin (30 µg) ve vankomisine (30 µg) direnç özellikleri disk difüzyon testi ile Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standarts Institue-CLSI) kriterlerine göre yapıldı<sup>11</sup>. Vankomisin MİK değeri E-test (AB Biodisk, Solna) ile belirlendi. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 E-test’de kalite kontrol olarak kullanıldı. DNA izolasyonu ve *vanA* gen amplifikasyonu için PCR şartları McLaughlin ve ark.’na<sup>12</sup> göre yapıldı.

## BULGULAR

Toplam 400 kloakal sürüntü örneğinin 1’inde VRE suşu izole edildi ve bu izolatın *E. faecium* olduğu identifiye edildi. Disk difüzyon metodu ile çeşitli antibiyotiklere direnç özelliği incelendiğinde penisilin, vankomisin,

eritromisin, tetrasiklin, gentamisin, streptomisin ve teikoplanine dirençli olduğu ve kuinopristin/dalfopristine orta derecede duyarlı (intermediate) olduğu belirlendi. Vankomisin için MİK değerinin 256 µg/ml’ den daha yüksek olduğu belirlendi. PZR ile *vanA* geninin araştırılması sonucunda bu izolatın *vanA* geni taşıdığı doğrulandı.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

VRE’nin hastane enfeksiyonlarından izolasyon sıklığının artması ve hayvanlardan olduğu kadar hayvansal gıdalardan da izole edilmeleri bu bakteriye verilen önemin bütün dünyada artmasına neden olmuştur.

Türkiye’de ilk VRE izolasyonu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından bildirilmiş olup günümüze kadar da giderek artan oranlarda izole edilmeye devam etmiştir<sup>13</sup>. Ülkemizde hastane izolatları arasında VRE prevalansının %0-10 arasında olduğu belirtilmektedir<sup>14</sup>. Hayvanlarda ise 2001 yılında Ankara’da, tavuk ve köpeklerden izole edilen enterokok suşlarının %13-14’ünde vankomisin direnci saptanmıştır<sup>15</sup>. Danimarka’da yemde antibiyotik büyütme faktörlerinin yasaklanmasından önce, broylar kökenli *E. faecium* izolatlarının %60-80’i antibiyotik büyütme faktörlerine karşı dirençli iken, yasaktan sonra bu oranın %5-35 oranına düştüğü bildirilmiştir<sup>16</sup>. Türkiye’de ise 1999 yılında avoparsinin yemlere katılması yasaklanmıştır. Çelik ve ark.’nın<sup>15</sup> yapmış oldukları bir çalışmada, 2001 yılında vankomisin direnci %13-14 oranında bildirilirken, 2005 yılında yapılan bu çalışmada VRE izolasyon oranının kanatlılarda %0.25 gibi oldukça düşük bir değere ulaştığı görülmektedir. Bu durum, Türkiye’de 1999 yılında hayvan yemlerine gelişmeyi artırıcı olarak avoparsin katılmasının yasaklanmasının sonucu olarak ortaya çıktığı olasılığını düşündürmektedir.

Vankomisin direnci ile ilgili birden fazla gen sorumlu olmasına rağmen transpozon (Tn1546) üzerinde taşındığı için epidemiyolojik açıdan en önemlisi *vanA* ilişkili dirençtir<sup>5</sup>. Ülkemizde insanlardan izole edilen VRE’lerin hepsinin *E. faecium* türü olması ve hepsinin *vanA* pozitif olması ile bu çalışmada broylarlerden izole edilen tek VRE’nin *E. faecium* olması ve *vanA* pozitif olması paralellik göstermektedir. Çalışmada sadece bir izolasyonun olmasına rağmen *vanA* ilişkili direncin konjugasyonla aktarılabilirliği göz önüne alındığında bu durumun insan sağlığı açısından önemli risk oluşturma potansiyeli mevcuttur.

## KAYNAKLAR

1. Quinn PJ, Carter ME, Mackey B, Cater GR: Clinical Veterinary Microbiology, 6th ed., pp. 127-136, Mosby Inter Ltd., Virginia USA. 2000.

2. **Descheemaeker PRM, Chapelle S, Devriese LA, Butaye P, Vandamme P, Goossens H:** Comparison of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates and glycopeptide resistance genes of human and animal origins. *Antimic Agents Chemother*, 43, 2032-2037, 1999.
3. **Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinson KG, Leclercq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olson-Liljequist B, Peixe LV, Sadovy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N:** Emergence and spread of vancomycin resistance among *Enterococci* in Europe. *Eurosurveillance*, 13, 1-11, 2008.
4. **Bruin MA, Riley LW:** Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization in hospital? A systematic review. *BMC Infect Dis*, 7, 1-11, 2007.
5. **Sung K, Khan SA, Nawaz MS:** Genetic diversity of Tn 1546-like elements in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Int J Antimicrob Agents*, 31, 549-554, 2008.
6. **Phillips I, Casewell M, Cox T, Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell:** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother*, 53, 28-52, 2004.
7. **Aarestrup FM:** Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist*, 1, 255-257, 1995.
8. **Bonten MJM, R Willems, RA Weinstein:** Vancomycin-resistant enterococci: Why they are here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*, 1, 314-325, 2001.
9. **Ceylan N, Çiftçi İ, İlhan Z:** Büyütme faktörü antibiyotiklere alternatif yem katkılarının etlik piliçlerde besi performansı ve bağırsak mikroflorası üzerine etkileri. *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 727-733, 2003.
10. **Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC:** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th ed., pp. 616-621, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997.
11. **Clinical Laboratory Standarts Institute:** M100-S17 Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları. 17. Bilgi Eki, 2007.
12. **Mclaughlin RE, Ferretti JJ:** Molecular approaches to the identification of *Streptococci*. Molecular Bacteriology. In, Woodford N, Johnson AP (Eds): Protocols and Clinical Applications. 117, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998.
13. **Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D:** Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *ANKEM Derg*, 13, 1, 1999.
14. **Aygün H, Memikoğlu OK, Tekeli A, Azap A, Yörük F:** Hastanede yatan riskli hasta gruplarında vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunun sürveyansı. *Türk Anest Rean Der Derg*, 36, 168-173, 2008.
15. **Çelik S:** Hayvan kökenli enterokok suşlarının virülens faktörleri. *Doktora Tezi*, Ankara Üniv Sağlık Bil Enst, 2001.
16. **Nollet L:** EU close to a future without antibiotic growth promoters. *World Poultry*, 21 (6): 14-15, 2005.