

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ HAYVAN TÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOK
İZOLATLARINDA *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2*
GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Devrim SARIGÜZEL**

**Danışman
Prof.Dr.Fuat AYDIN**

Doktora Tezi

**Ekim 2012
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇEŞİTLİ HAYVAN TÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOK
İZOLATLARINDA *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2*
GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Devrim SARIGÜZEL**

**Danışman
Prof.Dr.Fuat AYDIN**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD-942 kodlu proje ile desteklenmiştir**

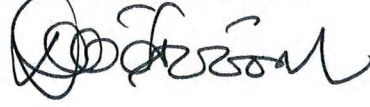
**Ekim 2012
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Devrim SARIGÜZEL

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Çeşitli Hayvan Türlerinden İzole Edilen Vankomisine Dirençli Enterokok İzolatlarında *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* Genlerinin Moleküler Yöntemle Araştırılması ” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Devrim SARIGÜZEL



Danışman

Prof.Dr.Fuat AYDIN



Anabilim Dalı Başkanı

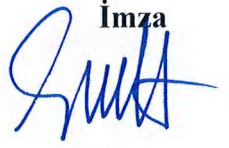
Prof.Dr.Fuat AYDIN

Prof.Dr.Fuat AYDIN danışmanlığında **Devrim SARIGÜZEL** tarafından hazırlanan “Çeşitli Hayvan Türlerinden İzole Edilen Vankomisine Dirençli Enterokok İzolatlarında *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* Genlerinin Moleküler Yöntemle Araştırılması ” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Mikrobiyoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

05/10/2012

JÜRİ

Danışman : Prof.Dr.Fuat AYDIN (Vet.Mikrobiyoloji AD)

İmza


Üye : Prof.Dr.K.Serdar DİKER (Ank.Ün.Vet.Mikrobiyoloji AD)



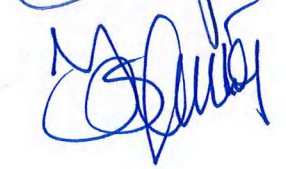
Üye : Prof.Dr.Hüseyin KILIÇ (Tıp Fak.Mikrobiyoloji AD)



Üye : Prof.Dr.Erol BAYTOK (Hayvan Bes.ve Bes.Hast.AD)



Üye : Doç.Dr.K.Semih GÜMÜŞSOY (Vet.Mikrobiyoloji AD)

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, aynı zamanda bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde çok büyük payı olan değerli hocam Prof.Dr. Fuat AYDIN olmak üzere Prof.Dr. Hüseyin KILIÇ'a, Prof.Dr. Erol BAYTOK, Prof.Dr. Fatma UYANIK, Doç.Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY ve Yrd.Doç.Dr. Seçil ABAY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında gerek bilgi ve tecrübe gerekse laboratuvar imkanlarından faydalanmamda büyük destek gördüğüm başta Prof.Dr. Duygu PERÇİN olmak üzere Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Araştırma projeleri birimine teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde bana büyük destek veren, tez çalışmamın baştan sona her anını benimle birlikte yaşayan sevgili eşim Uzm. Dr. Fatma MUTLU SARIGÜZEL'e, hayatım boyunca bana verdikleri destek için annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

**ÇEŞİTLİ HAYVAN TÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN VANKOMİSİNE DİRENÇLİ
ENTEROKOK İZOLATLARINDA *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* GENLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**
Devrim SARIGÜZEL

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ekim 2012
Danışman. Prof.Dr.Fuat AYDIN**

KISA ÖZET

Bu çalışmada, Kayseri bölgesindeki çeşitli hayvan türlerinin dışkı örneklerinde vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. varlığının incelenmesi, izole edilen suşların antibiyotik dirençlerinin saptanması ve izolatlarda *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinin moleküler yöntemle araştırılması amaçlanmıştır.

Mayıs- Ağustos 2010 ayları arasında her birinden 100'er adet olmak üzere sığır, broyler, yumurtacı tavuk ve köpeğe ait dışkı örnekleri çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerden izolasyon ve identifikasyon işlemi sonucu elde edilen enterokok suşlarının, disk difüzyon ve E-test yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları ve glikopeptid direnci belirlenmiştir. Multipleks PCR ile *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinin araştırılması yapılmıştır.

Örneklerden elde edilen 68 izolatın 63 (% 92,64)'ünün *E.faecium*, 3 adetinin (% 4,41) *E.gallinarum*, 2 adetinin de (% 2,94) *E.casseliflavus* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların disk difüzyon yöntemiyle 64 (% 94)'ü qoinupristin/dalfopristine, 16 (% 23,53)'i eritromisine, 16 (% 23,53)'sı tetrasikline, 9 (% 13,33)'u siprofloksasine, 7 (% 10,2)'i streptomisine, 10 (% 14,70)'u vankomisine ve 5 (% 7,3)'nin teikoplanine dirençli olduğu saptanmıştır. E-test yöntemi ile 10 adet izolat vankomisine ve 5 adet izolat teikoplanine dirençli bulunmuştur. İzolatların 32 (% 47)'nin çoğul ilaç direncine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan Multipleks PCR ile; tüm izolatların *vanA* ve *vanB* geni taşımadığı bunun yanında 3 adet suşun *vanC1* ve 2 adet suşun da *vanC2* geni taşıdığı tespit edilmiştir.

Türkiye'de çiftlik hayvanlarında avoparsin kullanımının yasaklanmasından sonra glikopeptid dirençli enterokokların varlığının düşük seviyede de olsa devam ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik dirençlilik, dışkı, enterokok, PCR, vankomisin.

**THE INVESTIGATION OF *vanA*, *vanB*, *vanC1* AND *vanC2* GENES IN
VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATES FROM VARIOUS
ANIMAL SPECIES BY MOLECULAR METHOD**

Devrim SARIGÜZEL

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Veterinary Microbiology
PhD. Thesis, October 2012
Supervisor: Prof. Dr. Fuat AYDIN**

ABSTRACT

In this study, it is aimed to investigate the occurrence of vancomycin resistance *Enterococcus* spp. in faecal samples of various animal species, to detect the antibiotic resistance of isolated strains and to examine vancomycin resistance genes (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*) via molecular method in Kayseri region.

The faecal samples of cattle, broiler, hens and dogs (100 animals from each species) were used as material between May and August of 2010. Antibiotic susceptibility and glycopeptide resistance of *Enterococcus* strains which was obtained after the isolation and identification process were detected by means of disk diffusion and E-test method. The investigation of *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* genes was conducted via multiplex PCR.

It was detected that 63 (92.64%) of 68 isolates, which were obtained from the samples, belong to *E.faecium*, 3 of them (4.41 %) belong to *E.gallinarum*, and 2 of them (2.94 %) belong to *E.casseliflavus*. It was determined via disk diffusion method that 64 (94 %) of isolates resistant to quinupristin/dalfopristine, 16 of them (23.53 %) to erythromycin, 9 of them (13.33 %) to ciprofloxacin, 16 of them (23.53 %) to tetracycline, 7 of them (10.2 %) to streptomycin, 10 of them (14.70 %) to vancomycin, and 5 of them (7.3 %) to teicoplanin. It was found out that 10 isolates were resistant to vancomycin and 5 isolates to teicoplanin. 32 isolates (47 %) have multiple antibiotic resistances. It was detected that none of the isolates carried *vanA* and *vanB* genes; however, 3 strains carried *vanC1* and 2 strains carried *vanC2* genes.

It was concluded that after the ban of using avoparcin over farm animals in Turkey, the occurrence of *Enterococcus* resistant to glycopeptide continued even if it was at low level.

Key Words: Antibiotic resistance, enterococci, faeces, PCR, vancomycin

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
 1.GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. ENTEROKOKLAR	3
2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi	3
2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikler	4
2.1.3. Tanımlama	8
2.1.4. Tiplendirme Yöntemleri	12
2.1.5. Virülans ve patojenite faktörleri	12
2.1.6. Enterokokların neden olduğu infeksiyonlar	17
2.1.6.1. Hayvanlarda görülen infeksiyonlar	17
2.1.6.2. İnsanlarda görülen infeksiyonlar	17
2.1.7. Antimikrobiyal Duyarlılıkları	19
2.1.7.1. İnterensek (Doğal) Direnç	20
2.1.7.2. Ekstresek (Kazanılmış) Direnç	21
2.1.8. Epidemiyoloji	28

Sayfa no

3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. KULLANILAN BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI	30
3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	31
3.3. KÜLTÜRLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	31
3.3.1. Katalaz Testi	32
3.3.2. PYR Testi	32
3.3.3. Eskülin Hidrolizi Testi	32
3.3.4. Rapid ID 32 Strep Sistemi	33
3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ	34
3.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi	34
3.4.2. E- Test Yöntemiyle Glikopeptid Direncinin Belirlenmesi	34
3.4.3 Çoğul Direnç	35
3.5. VRE SUŞLARINDA VANKOMİSİNE DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI	35
3.5.1 PZR yönteminin uygulanması	35
3.5.2. Nükleik asit izolasyonu	36
3.5.3. Bakteri kültürlerinden nükleik asit izolasyon prosedürü	36
3.5.4. DNA Amplifikasyonu	37
3.5.5. Testin uygulanması	38
4.BULGULAR	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
6.KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 2.1.	<i>Enterococcus</i> genusuna ait türlerin isim listesi	5
Tablo 2.2.	Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri	9
Tablo 2.3.	VRE’de fenotipik ve genotipik özellikler	27
Tablo 4.1.	<i>Enterococcus</i> spp. izolasyon oranları.....	40
Tablo 4.2.	<i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının tür düzeyinde ve örneklerle göre dağılımı	41
Tablo 4.3.	<i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık sonuçları	42
Tablo 4.4.	Çoğul ilaç dirençli <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarının dirençli oldukları antibiyotikler ve oranları.....	44
Tablo 4.5.	E-test yöntemi ile <i>E.faecium</i> izolatlarının vankomisin ve teikoplanin için MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri, MİK aralıkları ve duyarlılık oranları	45
Tablo 4.6.	VRE izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri	46
Tablo 5.1.	Dünyada ve ülkemizde kanatlılarda yapılan VRE çalışmaları.....	48
Tablo 5.2.	Dünyada ve ülkemizde sığır ve köpeklerde yapılan VRE çalışmaları	50
Tablo 5.3.	Dünyada ve ülkemizde kanatlılardan elde edilen <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarında antibiyotik direnç oranları	52
Tablo 5.4	Dünyada ve ülkemizde köpeklerden elde edilen <i>Enterococcus</i> spp. izolatlarında antibiyotik direnç oranları.....	53
Şekil 2.1.	Enterokok türlerine ait filogenetik bağlantı şeması.....	11
Şekil 3.1.	Enterococcusel agarda üreyen <i>Enterococcus</i> spp. kolonileri.....	32
Şekil 3.2.	PYR testi görünümü	33
Şekil 3.3.	<i>Enterococcus</i> spp. izolatının disk difüzyon ve E-Test görünümü	35
Şekil 4.1.	Multipleks PZR reaksiyonu ile elde edilen amplikonların elektroforezi sonucu oluşan jeldeki bant görüntüleri	45

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Af	: Agregasyon faktörü
AGR	: Accessory gen regulatör lokusu
BE	: Bile-esculine
CLSI	: Clinical and laboratory standards institute
CNA	: Columbia-kolistin-nalidiksik asit agar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EfaA	: <i>Enterococcus faecalis</i> antijen A Proteini
ESP	: Enterokokal surface protein
LAPase	: Leucine aminopeptidase
LTA	: Lipoteikoik asit
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
MLTS	: Multilocus sequence typing
MLVA	: Multiple locus variable-number tandem repeat analizi
MMP	: Matriks metallo proteinaz
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PCR	: Polymerase chain reaction
PEA	: Fenil etil alkol agar
PFGE	: Pulsed field gel elektroforesis
PI	: Patojenite adaları
PYR	: Pyrolidonyl-b-naftilamide
PYRase	: Pyrolidonyl arylamidase
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SDS-PAGE	: Sodyum–dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
TE	: Tris-EDTA
tRNA	: Taşıyıcı ribonükleik asit
VDE	: Vankomisine bağımlı enterokoklar
VRE	: Vancomycin resistance enterococci
WCP	: Tüm hücre protein profili

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enterokoklar sıcak kanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sisteminde, ayrıca böceklerde, bitkilerde, dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde de bulunur. Bu sebeple içme ve kullanma sularındaki fekal kontaminasyonun göstergesi ve indikatör mikroorganizma olmanın dışında, laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında kullanılmakta olup; süt ve et ürünleri ile diğer gıda maddelerinden de izole edilebilmektedirler (1-3).

Enterokoklar düşük virulanslı mikroorganizmalar olmalarına karşın toplum kaynaklı ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. Enterokoklar tarafından üretilen sitolizin ve agregasyon maddesi ile biyofilm oluşturma özellikleri çeşitli nozokomiyal hastalıklara neden olabilmektedir (4). Enterokoklar nozokomiyal bakteriyemide üçüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarında ikinci en sık görülen etkindir (5). Bu enfeksiyonların da yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir (6).

Enterokok'lar, beslenme ve bakım şartları uygun olmayan hayvanlarda değişik klinik bulgulara neden olmaktadır. Kanatlılarda, pulmoner hipertansiyon sendromuna, amiloid artropadiye, bakteriyemiye, ensafalomalaziye, nörolojik bozukluklara, endokarditislere, büyüme geriliğine ve beyinde fokal nekrozlara, köpeklerde otitis eksternaya, tay ve buzağılarda ise ishallere yol açtıkları bildirilmiştir (7-10).

Enterokoklar kalıtsal olarak sefalosporinler, aztreonam, penisilinaza dayanıklı penisilinler, aminoglikozidler (düşük düzey) ve klindamisine dirençlidirler.

Enterokoklar ayrıca plazmidler veya transpozonlar aracılığıyla yeni DNA kazanarak ya da mutasyonlar yoluyla çeşitli antibiyotiklere direnç kazanmakta bu antibiyotik direnç genlerini diğer Gram pozitif patojen bakterilere transfer edebildikleri ortaya konulmuştur (11-13). Direnç gelişen antibiyotiklerin çoğu enterokok infeksiyonlarının dışındaki diğer infeksiyonların tedavisinde kullanılırken enterokoklara selektif baskı uygulayan eritromisin, fluorokinolonlar, tetrasiklin ve kotrimaksazol gibi antibiyotiklerdir (14,15). Enterokokların çeşitli antibiyotiklere direncinin giderek artış göstermesi ve özellikle vankomisine dirençli enterokokların artışı önemlerini artırmaktadır. Özellikle Avrupada çeşitli hayvan yemlerinde büyüme faktörü olarak bir glikopeptid olan avoparsin kullanımı, vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşların hayvanlardan besin zinciri yoluyla insanlara yayılmasına yol açmıştır (16). Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç ilk kez 1988 yılında Uttley et al. (17) tarafından bildirilmiş ve daha sonra tüm dünyada hızla yayılmıştır. Türkiye’de ise ilk VRE suşu Antalya’da saptanmış ve 1998 yılında Vural ve ark. (18) tarafından bildirilmiştir. Bunun üzerine Ankara, Denizli, Kırıkkale ve İzmir’de yapılan çeşitli çalışmalarda kanatlı, sığır ve köpeklerde VRE taramalarında bulunulmuş birçoğunda vankomisin ve diğer antibiyotiklere direnç kazanmış enterokoklar tespit edilmiştir. Çoklu antibiyotik dirençli VRE’lerin tespit edilmesi bu suşların neden olduğu infeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle VRE suşlarının hayvan türlerinden izole edilmesi direncin yayılmasının kontrol altına alınması için önemlidir. Bu çalışmada, Kayseri bölgesindeki çeşitli hayvan türlerinin dışkı örneklerinde vankomisine dirençli *Enterococcus* spp. varlığının incelenmesi, izole edilen suşların antibiyotik dirençlerinin saptanması ve izolatlarda *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinin moleküler yöntemle araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile ölümcül hastane infeksiyonlarına neden olan VRE’lerin hayvansal kökenli suşlar ile olan yakınlıklarının araştırılması için gereken altyapıyı oluşturması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENTEROKOKLAR

2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Günümüzde “Enterokoklar” olarak adlandırılan mikroorganizmalar önceleri “fekal kökenli streptokoklar” adıyla gruplandırılmış olup ilk kez 1899 yılında Thiercelin tarafından Fransa’da yayımlanan bir makalede “insan gaitasında kısa zincirli veya çift halde görülen bakteriler” Enterokok olarak tanımlanmıştır. William MacCallum ve Thomas Hasting aynı yıl akut endokarditli bir hastadan elde ettikleri inatçı ve güçlü bir bakteriyi “*Micrococcus zymogenes*” olarak adlandırmışlardır. Birkaç yıl sonra Alexander Gordon muhtemelen hayvan gaitasıyla havadan kontamine olmuş sıvı besiyerinde fekal streptokok izole ettiğini; S. Houston lağım suyunda bol miktarda streptokok bulunduğunu bildirmiş ve suların insan gaitasıyla kontaminasyonunu göstermede yararlı olabileceğini ileri sürmüştür. İlk kez *Streptococcus faecalis* F.W. Andrews ve T.J. Holder tarafından 1906 yılında mannitolü ve laktozu fermente edip raffinozu fermente etmeyen ve sütün kesilmesine neden olan gaita kökenli mikroorganizma olarak tanımlanmıştır. Orla- Jensen 1919 yılında bu grupta fermentasyon özellikleri farklılık gösteren *Streptococcus faecium*’u ikinci bir mikroorganizma olarak tanımlamışlardır. J.M. Sherman 1935 yılında ve Helen U. Wing 1937 yılında *Streptococcus faecium*’a benzeyen ancak daha az fermentatif güç

gösteren üçüncü bir tür olan *Streptococcus durans*'ı tanımlamışlardır. "Enterokokal Grup" terimini J.M. Sherman 1937 ve 1938 yıllarında 9.6 pH'da, 10-45 °C arasındaki sıcaklık derecelerinde ve % 6.5 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreyebilen ve 60 °C'de 30 dakika canlılığını sürdürebilen streptokoklar için kullanmıştır. J.M. Sherman o tarihte bilinen enterokok türlerini enterokokal grup diğerlerini de "piyogenik, laktik ve viridan" gruplar olarak ayırmıştır. S.S Nowlan ve R.H. Deibel 1967 yılında *Streptococcus avium*'u enterokokal gruba eklemiştir. A.P.Kalina 1970 yılında enterokokal streptokoklar için bir cins oluşturulmasını ve hücresel dizilim ve fenotipik özelliklerine göre *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium*'un "*Enterococcus*" olarak adlandırılmasını önermiştir. Bu öneri dikkate alınmayıp enterokoklar *Streptococcus* genusunda yer almaya devam etmişlerdir. K.H. Schleifer ve R.Klipper-Baltz 1984 yılında genetik kanıtların *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium*'un diğer streptokoklardan farklı olduklarını gösterdiğini ve ayrılması gerektiğini belirtmiştir. *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* o tarihten bugüne *Enterococcus* genusu içerisinde yer almaktadır (19). Günümüzde *Enterococcus* cinsine dahil etme veya yeni *Enterococcus* türleri tanımlama kriterleri farklı moleküler tekniklerin (DNA-DNA reasosiyasyon deneyleri 16S rRNA gen sekanslaması ve total protein profil analizi) ve fenotipik testlerin sonuçlarını irdeleyen polifazik yaklaşımla belirlenmektedir (20). En son çalışmalar sonucunda *Enterococcus* genusuna ait türlerin Ocak 2011 ayında yayımlanan isim listesi Tablo 2.1'de (21), 2005 yılında belirtilen filogenetik bağlantı şeması Şekil 2.1'de sunulmuştur (20).

2.1.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar katalaz negatif Gram pozitif tekli ya da ikili koklardan oluşan mikroorganizmalardır. Katı besi yerinden üreyen kolonilerinden yapılan preparatların Gram boyamalarında kokobasil olarak görünürler. Tiyoglikolatlı besiyerinde üremeler ovoid veya zincir şeklindedir. Kanlı agarda 24 saatlik üreme sonunda genellikle 1-2 mm çapında kabarık, gri-beyaz renkli, S tipi koloniler oluşturmaktadırlar. Tavşan, at veya insan kanlı agarlarda *E.faecalis*'lerin yaklaşık 1/3'ü beta hemolitik olarak görülürken koyun kanlı agarda hemoliz yapmazlar. Diğer türler genellikle alfa ya da non hemolitikdir (20).

Enterokoklar fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Embden-Meyerhof –Parnas yolunu izleyen homofermentatif metabolizmaları vardır. Karbonhidratları laktik asite indirgemeleri nedeniyle laktik asit bakterileri olarak da adlandırılırlar. Gaz oluşturmada ürerler. Optimal üreme ısıları 35 °C olup 10-45 °C’ler arasında üreyebilirler. Yüksek oranda tuz ve safra tuzlarını tolere ederler ve % 6.5 NaCl ile % 40 safra tuzu varlığında üreyebilirler. Eskulini hidrolize eder, Bile-Esculine (BE) agarda rahatlıkla ürerler (20).

Tablo 2.1. *Enterococcus* genusuna ait türlerin isim listesi (21)

S.No	Enterokok Türleri
1	<i>Enterococcus asini</i>
2	<i>Enterococcus aquimarinus</i>
3	<i>Enterococcus avium</i>
4	<i>Enterococcus caccae</i>
5	<i>Enterococcus camelliae</i>
6	<i>Enterococcus caccae</i>
7	<i>Enterococcus camelliae</i>
8	<i>Enterococcus canintestini</i>
9	<i>Enterococcus canis</i>
10	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
11	<i>Enterococcus cecorum</i>
12	<i>Enterococcus columbae</i>
13	<i>Enterococcus devriesei</i>
14	<i>Enterococcus dispar</i>
15	<i>Enterococcus durans</i>
16	<i>Enterococcus faecalis</i>
17	<i>Enterococcus faecium</i>
18	<i>Enterococcus flavescens</i> => <i>Enterococcus casseliflavus</i>
19	<i>Enterococcus gallinarum</i>

Tablo 2.1. *Enterococcus* genusuna ait türlerin isim listesi (21) (devamı)

S.No	Enterokok Türleri
20	<i>Enterococcus gilvus</i>
21	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>
22	<i>Enterococcus hermanniensis</i>
23	<i>Enterococcus villorum</i>
24	<i>Enterococcus italicus</i>
25	<i>Enterococcus malodoratus</i>
26	<i>Enterococcus moraviensis</i>
27	<i>Enterococcus mundtii</i>
28	<i>Enterococcus pallens</i>
29	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>
30	<i>Enterococcus porcinus</i> => <i>Enterococcus villorum</i>
31	<i>Enterococcus pseudoavium</i>
32	<i>Enterococcus raffinosus</i>
33	<i>Enterococcus ratti</i>
34	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
35	<i>Enterococcus saccharominimus</i> => <i>Enterococcus italicus</i>
36	<i>Enterococcus seriolicida</i> => <i>Lactococcus garvieae</i>
37	<i>Enterococcus silesiacus</i>
38	<i>Enterococcus solitarius</i> => <i>Tetragenococcus solitarius</i>
39	<i>Enterococcus sulfureus</i>
40	<i>Enterococcus termitis</i>
41	<i>Enterococcus thailandicus</i>
42	<i>Enterococcus hirae</i>

Enterokokların Gram negatif bakterileri de içeren karışık örneklerden izole edilmeleri için selektif besiyeri olarak azid içeren Safra-eskulinazid agar veya Enterococcosel agar, Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar (CNA) veya Fenil etil alkol agar (PEA) kullanılabilir (22). Selektif besiyerlerinin içerdikleri kimyasal maddelere bağlı olarak koloni rengi değişebilir. Örneğin Safra-Eskulin-Azid agar gibi eskulin içeren agarda koloniler siyah hale ile çevrelenmiş, gri-beyaz koloniler olarak görülebilirken; tetrazolium tuzları içeren agarda kolonilerin ortasında tuğla kırmızısı renk oluşur (17).

E. cecorum, *E. columbae*, *E. pallens*, *E. saccharolyticus*, *E. canintestini*, *E. devriesei*, *E. moraviensis* hariç pek çok enterokok türü, pyrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek pyrolidonyl-b-naftilamide (PYR)'i hidrolize ederler. Bütün suşlarda leucine aminopeptidase (LAPase) aktivitesi görülür ve leucine β -naphthylamide'i hidrolize ederler. Birkaç türü hareketlidir (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). Bazı türler ise pigmentlidir (*E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundti*, *E. pallens* ve *E. sulfureus*). Enterokoklar porfirinleri sentezleyemez; dolayısıyla sitokrom enzimleri yapamazlar. Bazı *E. faecalis*'ler kanlı besiyerinde üretildiğinde sitokrom aktivitesi gösterebilir ve zayıf olarak katalaz pozitifliğine yol açabilirler. Ayrıca *E. haemoperoxidus* türlerinde de katalaz pozitifliği bildirilmiştir. Bütün suşlar homofermentatiftirler. Gaz oluşturmazlar ve glukoz fermentasyonunun son ürünü laktik asittir (23).

Katalaz negatif, Gram pozitif bir kokun enterokok olarak doğru tanımlanabilmesi için izolatin BE, PYR, LAP testlerinin pozitif olması, % 6,5 NaCl varlığında 45°C'de üremesinin tespit edilmesi gerekmektedir. Sadece BE testi ve %6,5 NaCl'li ortamda üreme özelliği yeterli olmayabilir. Çoğu Enterokok suşu hücre duvarına bağlı gliserol teikoik asit içerir. Bu da Lancefield sınıflamasında D grubu antijeni olarak tanımlanır. D grubu antijenleri enterokokların % 80 inde mevcut olmasının yanında *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. ve bazı *Vagococcus* spp., suşları Anti-D grubu serumu ile reaksiyon verebilmektedir. Enterokokların DNA'sının G+C içeriği % 32-44 arasında değişmektedir. Genom büyüklüğü yaklaşık 2000-3500 kb arasındadır. GenProbe tarafından üretilen AccuProbe *Enterococcus* genetik prob, enterokokal rRNA segmentine bağlanarak Enterokok tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ancak *Vagococcus* spp. türlerinde bu prob ile reaksiyon verebilmektedir (17,24).

2.1.3. Tanımlama

Katalaz negatif, Gram pozitif bir kokun *Enterococcus* spp. ya da yakın bir cins olduğu belirlendikten sonra Tablo 2.2’de belirtilen geleneksel testler kullanılarak türler tanımlanabilir.

Enterokoklar mannitol, sorbitol ve sorboz içeren besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş gruba ayrılırlar (17).

Grup 1: *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. pallens*, *E. gilvus*, *E. devriesei*, *E. hawaiiensis*’den oluşur. Bu türler mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit oluşturur, ancak arginini hidrolize etmezler.

Grup 2: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E. mundtii* ve *E. gallinorum*, *E. sanguinicola*’dan oluşur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize ederler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler. İnsan kaynaklı suşlar daha çok bu grupta yer alırlar.

Grup 3: *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti*, *E. canintestini* bu grupta yer alır. *E. faecalis* ile *E. faecium*’un mannitol negatif varyantları bu grubu oluşturur. Bu gruptaki türler D antijeni içermez, arginini hidrolize ederler, fakat mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmazlar.

Grup 4: *E. aquimarinus*, *E. sulfurens*, *E. asini*, *E. caccae*, *E. phoeniculicola* ve *E. cecorum* bu grupta bulunmaktadır. Bu gruptaki türler mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfureus* asit oluşturmaz.

Grup 5: *E. canis*, *E. columbae*, *E. hermanniensis*, *E. italicus*, *E. moraviensis* bu grupta bulunur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

Tablo 2.2. Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri (20).

Türler	Fenotipik Özellikler ^a											
Grup I	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. saccharolyticus^b</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hawaiiensis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Grup II												
<i>E. faecium</i>	b+c	-	+	+	V	V	-	-	-	b+c	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	b+c	+	V	+	b-c	b+c	b+c	+	V	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	b+c	+	-	+	-	b+c	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	b+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	b+c	-	b+c	-	+	-	+	-	-	b+c	+	-
<i>E. haemoperoxidus^b</i>	b+d	-	b+d	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>E. sanguinicola</i>	+	-	+	-	-	-	b+e	-	-	+	-	-
<i>Lactococcus</i> spp.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Grup III												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grup IV												
<i>E. cecorum^b</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. phoeniculicola^b</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. asini^b</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. caccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	b+d
Grup V												
<i>E. canis^b</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. columbae^b</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-

Tablo 2.2. Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri (20). (devamı)

Türler	Fenotipik Özellikler ^a											
Grup I	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
<i>E. moraviensis</i> ^b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. hermannienseis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. italicus</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+
<i>Vagococcus fluvialis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

^a Kısaltmalar ve semboller : **MAN**, mannitol; **SOR**, sorboz; **ARG**, arjinin; **ARA**, arabinoz; **SBL**, sorbitol; **RAF**, raffinoz; **TEL**, :%0,04 tellürit; **MOT**, hareket; **PIG**, pigment; **SUC**, sükreoz; **PYU**, pürivat; **MGP**, metil-a-D-glukopiranozid; +, suşların %90 veya fazlası pozitif; -, suşların %90 veya fazlası negatif; V, değişken (suşların %11-89'u pozitif)

^bTip suşları verilerine dayanan fenotipik özellikler.

^cNadir istisnalar söz konusu (suşların<%3'ü farklı reaksiyonlar gösterir).

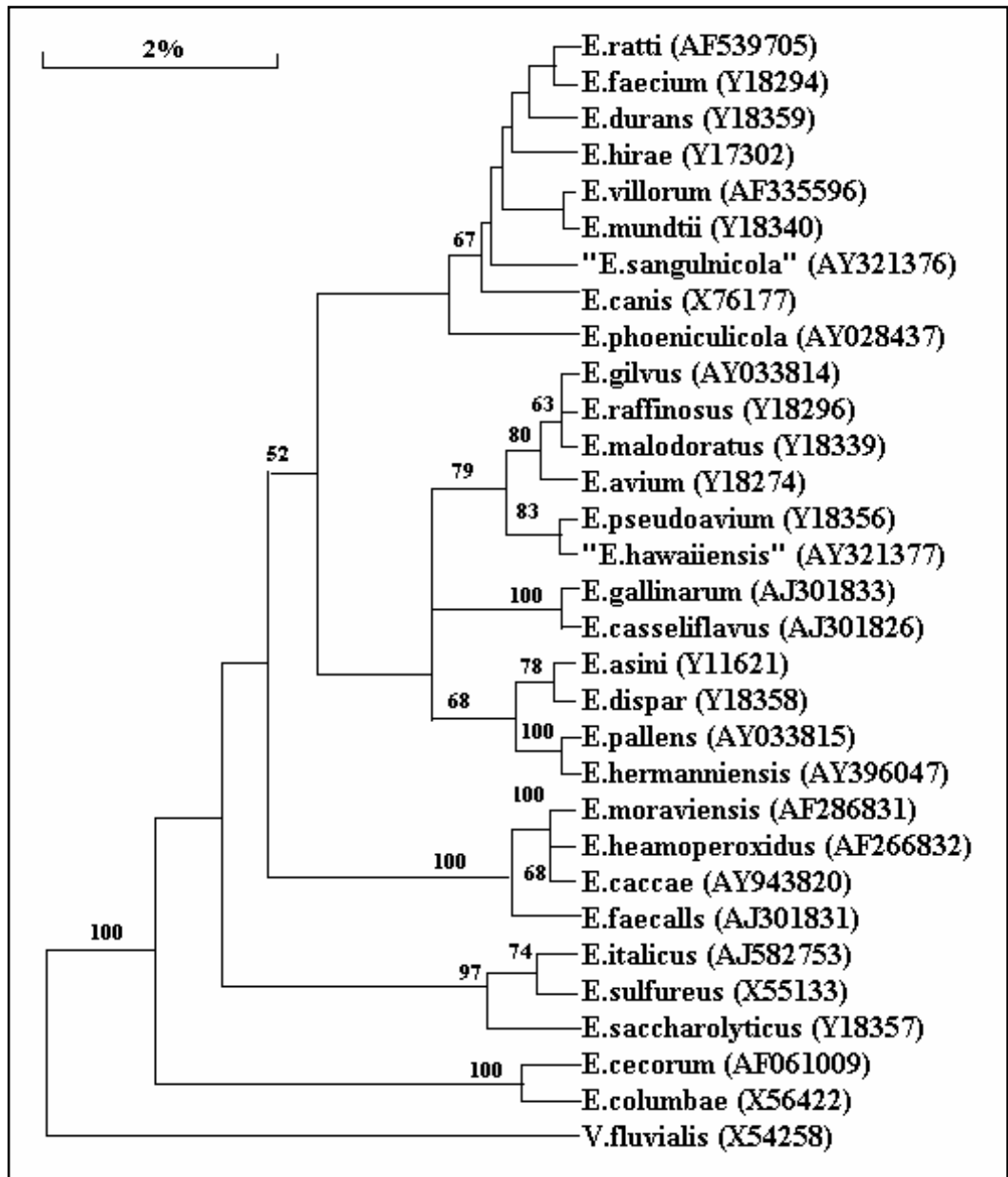
^dGeç pozitif(≥ 3 gün inkubasyon).

^eZayıf reaksiyon

Enterokok türlerinin tanımlanmasında kullanılmak üzere minyatürize, manuel, yarı otomatize veya tam otomatize sistemler ticari olarak mevcuttur. Ticari sistemler arasında API20S, Api Rapid ID 32 Strep sistemleri (bioMerieux Vitek, Inc, Hazelwood, Mo.) Crystal Gram pozitif Crystal hızlı gram pozitif tanımlama sistemleri (Becton Dickinson Microbiology Systems), Vitek sisteminin Gram Pozitif Tanımlama Kartı (bioMerieux) ve MicroScan Walkaway System Gram Pozitif Tanımlama paneli (Dade MicroScan, West Sacramento, Calif.) sayılabilir. Bu sistemlerin tanımlamadaki doğrulukları moleküler tekniklerle karşılaştırılmıştır (25,26).

Son yıllarda enterokok türlerinin hızlı ve doğru tanımlanması için moleküler tekniklerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına uyarlanması ile ilgili çalışmalar yaygınlaşmıştır. Bu yöntemler; Sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE), tüm hücre protein profili (WCP), vibrasyonel spektroskopik analiz, proton magnetik rezonans spektroskopik analiz, randomize amplifiye polimorfik DNA analizi, 16S rRNA genin sekans analizi, PCR ile çoğaltılmış 16S rRNA genin restriksiyon-fragman-uzunluk-polimorfizm analizi, 16S rRNA genin veya *groESL* geninin geniş aralık (broad range) amplifikasyonu, 23S rRNA geninin domain V'in sekanslaması, tRNA veya rRNA'nın "intergenic spacer" amplifikasyonu, D-ala:D-ala ligazlarının (*ddl*) ve vankomisin direnç genlerinin amplifikasyonu, *Enterococcus* protein A (*efaA*) genlerinin veya *E.faecalis* kollagen adezin geninin (*ace*) problemlenmesi, EF-Tu (*tuf*) elongasyon

faktörü veya pEM1225 genlerinin amplifikasyonu, manganeye bağımlı süperoksit dismutaz (*sodA*) geninin sekanslanması, chaperonin 60 (*cpn60*) geninin sekanslanması, RNA polimeraz β alt birim geninin (*rpoB*) sekanslanması, RNA polimeraz alt ünite ve fenilalanil-tRNA sentaz (*pheS*) genlerinin ve ATP sentaz (*atpA*) geninin sekanslamasıdır. Değişik enterokok türlerinin referans laboratuvarlarda moleküler tekniklerle tanımlanması için WCP profillerinin SDS-PAGE analizi ve 16S rRNA genlerinin sekanslanması sık kullanılan yöntemlerdir (27,28). Şekil 2.1'de *Enterococcus* cinsi içinde bulunan türlere ait suş tiplerinin 16S rRNA gen sekanslarının kıyaslamaları ile oluşturulmuş dendrogram gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Enterokok türlerine ait filogenetik bağlantı şeması (20)

2.1.4. Tiplendirme Yöntemleri

Enterokokların birçok antibiyotiğe direnç gösteren önemli bir hastane patojeni olarak belirlenmesi ve *Enterococcus* enfeksiyonlarının dış kaynaklı olduğuna dair kanıtların ortaya çıkması suşların tiplendirilmesi ve epidemiyolojik çalışmalara duyulan ihtiyacı arttırmıştır. Suşlar arasında farklılıkları ortaya koymak için kullanılan klasik fenotipik yöntemler çoğunlukla yeterli ayırımı yapamamış ve epidemiyolojik çalışmalar için yararı kısıtlı olmuştur (27).

Enterococcus suşları arasında ayırım için, kromozomal DNA restriksiyon endonükleaz profillerinin pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile tayini kullanılırsa daha başarılı olmaktadır. PCR ürünlerinin sekanslaması ve PCR ürünlerinin restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm analizleri de enterokoklarda antibiyotik direnç genlerinin saptanması ve farklılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. PFGE enterokok enfeksiyonlarının epidemiyolojik analizinde altın standart olarak kabul edilmektedir (29,30).

Son yıllarda iki çeşit güçlü moleküler teknik multilokus sekans tiplendirmesi (MLST) ve multiple locus variable-number tandem repeat analizi (MLVA) geliştirilmiştir. Bunlar enterokok popülasyonu içerisinde yer alan klonal kompleksleri tanımlamak ve suşlar arasında genetik bağlantıyı araştırmak amacıyla kullanılmaktadır (31).

2.1.5. Virülans ve patojenite faktörleri

Enterokoklar gastro-intestinal sistemde kommensal olarak bulunmalarına rağmen, belirli predispozan durumlarda barsak dışı bölgelere yayılarak hastalıklara sebep olurlar. Mikroorganizmanın antibiyotik direnci ve virulansla ilişkili yeni genetik materyal kazanabilme özelliği onu daha virulan yapar ve konakta farklı bölgelere kolonizasyonuna, alışılmışın dışında enfeksiyon oluşturmaya yardım eder (19,32).

Enterokokların virulansını açıklayan faktörler henüz tam olarak bilinmemektedir. Enterokoklar klasik virülans faktörlerine sahip olmamalarına rağmen, çok sayıda antimikrobiyal ajana dirençli olmaları, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalarda enterokokların diğer mikroorganizmalara göre avantaj kazanıp çoğalmalarına izin vermekte ve süperenfeksiyonlara yol açmaktadır (4).

Mikroorganizmanın virulansı genomda bulunan patojenite adaları (PI) denilen özel bölgelerde ve plazmidlerde kodlanan virulans genleri ile düzenlenir. Enterokokların patojenite adaları ilk kez 1980 yılında nozokomiyal salgına yol açan çoklu ilaç dirençli *E.faecalis*'te tanımlanmıştır. G+C oranı % 32,2, büyüklüğü de 150 kb civarında olan bu PI; enterokokal surface protein (*esp*), agregasyon faktör (*asa*) ve sitolizin (*cyl*) gibi virulans genlerinin yanı sıra transpozazlar, transkripsiyonel regülatörler ve proteinleri kodlayan genlerin yer aldığı 129 ORF bölgesine sahiptir (19,32-36).

Enterokokların en önemli virulans faktörleri (32,37,38):

1. Hemolizin veya sitolizin,
2. Jelatinaz,
3. Enterokokal surface protein,
4. Agregasyon faktörü,
5. Kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri
6. Lipoteikoik asit
7. Süperoksitler
8. Seks feromonları
9. Hyaluronidaz
10. Efa
11. AS-48
12. Antibiyotik direncidir.

Hemolizin/Sitolizin

Hemolitik özellik taşımaktadır. Sitolizin kodlayan gen bölgesi plazmid üzerinde ya da bakteriyel kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir. İmmun sistem üzerinde makrofaj ve polimorfonükleer lökositlere zarar verici etkisi olduğu ve direkt doku harabiyeti yapabildiği gösterilmiştir. Ayrıca çok sayıda Gram pozitif bakteriyi etkileyebilen bakteriyosin olarak da işlev gördüğü gösterilmiştir. Toksinin insan ile at kanlı agarlarda hemolitik aktiviteye sahipken, koyun eritrositlerinde etkili olmayışı klinik laboratuvarlarda tanısal açıdan önemli bir özelliktir (39). İnsanlarda patojen olan enterokok suşları arasında, sitolizin üretenlerin oranının, nonpatojen olduğu düşünülen

suşlardan fazla olduğu gösterilmiştir. Sitolizin üretimi salgınlardan izole edilen *E. faecalis* suşlarında % 60' a varan sıklıkta saptanabilen bir virülans faktörüdür (40,41).

Jelatinaz

Enterokoklar tarafından üretilen jelatinaz, jelatin, kollajen gibi bazı bioaktif peptitleri hidrolize edebilen, matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstra selüler çinko içeren bir üyesidir (37). Jelatinaz üreten *E.faecalis* suşlarının akut toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve endokardit oluşumunu sağladığı belirtilmiştir. Jelatinaz üretiminin inhibisyonunun doku kültüründe kemik rezorbsiyonunu azalttığı da gösterilmiştir (40). *E.faecalis* suşlarında jelatinaz üretimini, Stafilokokal accessory gen regülatör lokusu (AGR) nun bazı bölümlerine benzer dizi içeren “*fsr*” lokusu regüle eder. Farklı materyalden köken alan *E faecalis* suşlarında jelatinaz üretim oranlarının farklı olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (32,37).

Enterokokal Surface Protein (ESP)

Yüksek moleküler ağırlığa sahip, enterokokal surface proteini Esp, 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alan *esp* geninde kodlanır ve konjugasyonla enterokok izolatları arasında aktarılabilir. Esp, salgına yol açan *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarında bulunduğundan, epidemik suşları gösteren bir marker olduğu düşünülmektedir (42,43).

Agregasyon faktörü(Af):

Agregasyon faktör(Af), Bir yüzey proteindir. Birçok özelliği ile bakterinin virülansına katkıda bulunmaktadır. Etkin alıcı ve verici hücre birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda bakterilerin agregasyonunu da sağlayarak virülansa katkıda bulunmaktadır. Agregasyon faktörü, enterokoklara kalp kapakları ve böbrek epitel hücrelerine bağlanma ve bu sayede endokardit ve üriner sistem infeksiyonu oluşturma yeteneğini sağlamaktadır. *E. faecalis* suşlarına katetere tutunma yeteneğini, agregasyon faktörü sağlamaktadır. Özellikle katater infeksiyonlarında, *E. faecalis* izolasyonu *E. faecium'* a göre daha fazladır (39).

Kapsül, Hücre Duvarı Polisakkaritleri

Klinik *E.faecalis* izolatlarında yaygın olarak üretilen kapsül polisakkaritinin dışında *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarında ikinci bir kapsül polisakkariti daha tanımlanmıştır. Her iki polisakkaride karşı oluşan antikorlar koruyucu özellik göstermektedir. Enterokoklarda hücre duvarı, beta-D glikoz-1-fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Bu yapılar enterokokların virulansını ve immunitesini etkilemektedirler (32).

Lipoteikoik asit (LTA)

LTA, trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi pek çok ökaryotik hücreye bağlanabilmektedir. *E.faecalis* suşlarında adhezif özelliği gösterilen LTA'nın plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak *E. faecalis*'in virulansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (37,44).

Süperoksitler

E.faecalis'lerin çoğu ve bazı *E.faecium* türleri tarafından ekstraselüler süperoksitlerin sentezlenip mikro-çevreye salındığı, bunun da bakterinin hayat süresini uzattığı gösterilmiştir. Enterokoksik bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik suşların gaita kökenli izolatlardan daha yüksek oranda süperoksid radikali ürettiği gösterilerek, süperoksid üretiminin virulansla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (32,37,38).

Seks Feromonları

Seks feromonları kromozomda kodlanan, 7-8 amino asit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. *E.faecalis*'te sinyal peptitleri olarak alıcı ve verici hücre arasında sıkı temas sağlar ve konjugatif plazmidin geçişini kolaylaştırırlar (37,38,45).

Ayrıca antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virulans faktörleri seks feromon sistemi ile *E.faecalis* suşları arasında yayılabilir (40). Bazı seks feromonları nötrofiller için kemotaktiktir, süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükler ve doku hasarı oluşturur (19,37).

Hyaluronidaz

Streptokokların dışında stafilokoklar gibi bazı Gram pozitif bakterilerde *hyl* geninde kodlanan hyaluronidaz enzimi, çeşitli canlılar tarafından üretilir. Hyaluronidaz, bağ dokudaki mukopolisakkaritlerin bir kısmını depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlayan bir enzimdir. Ayrıca hyaluronik asidin parçalanma ürünü olan disakkaritler de bakteriler için besin kaynağı olabilir. Hyaluronidaz diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini kolaylaştırabilir ve doku hasarının şiddetini arttırabilir (24,37).

***Enterococcus faecalis* antijen A Proteini (EfaA proteini)**

İlk olarak endokarditlerden izole edilen *E.faecalis* suşlarında tanımlanan EfaA proteini, *efaA* geninde kodlanır. EfaA'nın aminoasit dizisi, streptokokal adhesinler olarak bilinen proteinlerle yakınlık göstermektedir. Mikroorganizmanın yaşaması ve çoğalması için mangan gerekmektedir ve *efaA* mangandan fakir ortamda fazla miktarda eksprese edilir. EfaA'nın endokarditlerde adhesin olarak fonksiyon gördüğü ve klinik örneklerden, hastane ortamından, süt, peynir ve et gibi gıda izolatlarından izole edilen *E. faecalis* suşlarında da *efaA*'nın bulunduğu gösterilmiştir (37).

AS-48

İlk olarak *E.faecalis* S-48 suşundan izole edilmiştir. Plazmid de kodlanan peptit yapılı bir bakteriyosin olup gram pozitif ve gram negatif birçok bakteriye karşı sitolitik aktivite gösterir. Pozitif şarjlı olduğu için ve iyon geçişini indüklemesinden dolayı, hedef hücrede sitoplazmik membran potansiyelinin bozulmasına yol açtığı düşünülmektedir (37).

Antibiyotik Direnci:

İntestinal florada bulunan, antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virülans özelliklerine sahip suşlar, antibiyotik kullanımı sonucu duyarlı suşların ortadan kalkmaları sonucunu doğurmaktadır. Böylece bu suşlar hastaların bir kısmında gastrointestinal florada doku invazyonuna neden olmaktadır. Virülans faktörleri arasında bulunan antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır (39,41).

2.1.6. Enterokokların neden olduğu infeksiyonlar

2.1.6.1. Hayvanlarda görülen infeksiyonlar

Enterokok'lar, hayvanlarda değişik klinik bulgulara neden olmaktadır. *Enterococcus faecalis* tavuklarda, pulmoner hipertansiyon sendromuna ve amiloid artropadiye neden olmaktadır. *E. durans* ve *E. hirae* ise tavuklarda bakteriyemiye, ensafalomalaziye, nörolojik bozukluklara, endokarditislere, büyüme geriliğine ve beyinde fokal nekrozlara yol açmaktadırlar. Ayrıca enterokoklar broylerde kemik lezyonlarına ve topallıklara sebep olurlar. Devriese et al. (46) tarafından *E.faecalis*'in kanaryalarda tracheitise ve yavru ördeklerde sistemik infeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir. Enterokoklar kedi ve köpeklerde otitis eksternaya ve nadiren de üriner sistem infeksiyonlarına neden olmaktadır. *E.durans*, *E.hirae* ve *E.villorum* türleri köpek, kedi, tay ve buzağılarda ishale yol açmaktadır. Lapointe et al. (47) tarafından *E.hirae*'nin bir kedide enteropatiye, karaciğer safra kanalı ve pankreatik kanalında supuratif yangıya neden olduğu rapor edilmiştir.

2.1.6.2. İnsanlarda görülen infeksiyonlar

Son yıllarda enterokokların neden olduğu infeksiyonlar belirgin şekilde artmış olup, özellikle hastane infeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ön sırada yer almaya başlamıştır. Enterokoklar aslında çok virülen değildir. Özellikle hastaneye yatırılan yaşlı, immünsuprese ve ciddi hastalığı olanlarda hastalık oluşturmaktadır. Enterokok kökenli infeksiyonların arasında üriner sistem infeksiyonları en sık rapor edilen infeksiyonlardır (41,48).

Enterokoklar bakteriyemi, endokardit, üriner enfeksiyonlar, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar, yara ve doku enfeksiyonları, kolesistit, menenjit, neonatal sepsis, hastane kaynaklı pnömoni ve sepsis gibi enfeksiyonlara neden olabilirler (49-53). Enterokoklar nozokomiyal bakteriyemide üçüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonların da ikinci en sık görülen etkindir (54,55).

Tüm enterokok infeksiyonlarının % 80-90'ından *E. faecalis*, % 5-15'inden ise *E. faecium* sorumludur. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* ve *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türleri klinik örneklerin %5'inden izole edilmiştir (41,56).

Üriner sistem infeksiyonları

Üriner sistem infeksiyonları enterokokların en sık neden olduğu infeksiyonlardır. Büyük bölümü hastane kaynaklı olan bu infeksiyonlar sistit, piyelonefrit, prostatit ve perinefritik apse gibi klinik tablolarla seyredebilir. Hemolitik enterokokların böbrek infeksiyonuna neden olma oranları diğer suşlara göre daha sık olmakla birlikte üriner sistem girişimleri, kateterizasyon, özellikle sefalosporinlerin kullanımı en önemli risk faktörleridir. Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarında, sağlıklı kadınların % 5'inden azında enterokok izole edilmektedir (56,57).

Endokardit

Enterokoklar infektif endokarditlerin *S.viridans* ve *S.aureus*'dan sonra en sık rastlanılan üçüncü önemli etkenidir. Bakteriyel endokarditlerin % 5-15'inde enterokoklar etkendir ve en sık *E.faecalis* izolasyonu yapılmaktadır. Hastalık cerrahi yolla veya çeşitli manipulasyonlarla bakterinin gastro-intestinal sistemden veya çoğunlukla genitoüriner sistemden translokasyonu ile endojen kaynaklı subakut endokardit şeklinde başlar (58).

Bakteriyemi

Enterokokal bakteriyemi, sıklıkla görülen bir durumdur. Hastane infeksiyonları içerisinde giderek artan öneme sahip olan VRE bakteriyemileri, hastane kökenli tüm bakteriyemiler içerisinde Avrupa'da 4. ABD'de ise 3. sıklıkta görülmektedir. VRE bakteriyemisi genellikle nozokomiyal kaynaklı olup hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi veya parenteral beslenme, cerrahi girişimler, ciddi hastalıklar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, üriner kateterler ve nötrojeni risk faktörleridir (38,58).

Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokoklar, karın içi ve pelvik enfeksiyonlarda sıklıkla aerob ve anaerob mikroorganizmalarla beraber bulunur. Ancak bu enfeksiyonlarda enterokoklar sıklıkla göz ardı edilmekte ve hastalara enterokoklara etkisi olmayan antimikrobiyal tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Enterokoklar, nefrotik sendrom veya sirozlu hastalarda gelişen spontan peritonit ve periton dializi uygulanan vakalarda gelişen abdominal enfeksiyon veya intraabdominal abselerde tek mikroorganizma olarak izole edilebilmektedir. Ayrıca salpenjit, endometrit gibi peripartum maternal enfeksiyonlar ve sezeryan sonrası apselerde de etken olabildikleri gösterilmiştir (19,58).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokoklar nadiren selülit veya derin doku enfeksiyonlarına yol açarlar. Cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında diğer bakteriler ile birlikte izole edilebilirler (58).

Menenjit

Enterokokal menenjit nadiren görülür ve genellikle sentral sinir sisteminde anatomik bir defekt, geçirilmiş beyin ameliyatları veya kafa travması veya ventrikülo peritoneal şant gibi predispozan faktörlerin varlığında ortaya çıkabilir. Ayrıca bakteriyemiler, AIDS ve akut lösemi gibi immünsüprese hastalarda da VRE menenjit görülebilir. Etken diğer enterokok enfeksiyonlarında olduğu gibi sıklıkla *E. faecalis* olup daha seyrek olmak üzere *E. faecium*'dur (58,59).

Neonatal enfeksiyonlar

Enterokoklar yenidoğan için de önemli bir patojendir. Yenidoğanlarda erken ve geç sepsise neden olur. Enfeksiyonların % 77'den fazlası kateteri olan yenidoğan bebeklerde görülür. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde VRE'nin neden olduğu enfeksiyonlara bağlı nozokomiyal salgınlar bildirilmektedir. Enterokokkal suşların %82'si *E. faecalis*, %14'ü *E. faecium* olarak tespit edilmiştir. Enterokoklara bağlı üriner sistem enfeksiyonlarına yenidoğanlarda nadiren rastlanır (60).

2.1.7. Antimikrobiyal Duyarlılıkları

Enterokoklarda antimikrobiyal direnç interensek (kromozomal) ve eksterensek (kazanılmış) direnç olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir.

İnterensek Direnç:

- a) Aminoglikozit Direnci (düşük düzeyde)
- b) Beta laktamlar (relatif olarak yüksek MİK değerleri)
- c) Linkozamidler (düşük düzeyde)
- d) Trimetoprim-sülfametoksazol (sadece in vivo)
- e) Quinupristin/dalfopristin (sadece *E. faecalis*)

Ekstreensek Direnç:

- a) Betalaktamlar (PBP'lerde değişiklik)

- b) Penisilin ve ampisilin (beta laktamaz)
- c) Aminoglikozid direnci (yüksek düzeyde)
- d) Glikopeptid direnci
- e) Linkozamidler (yüksek düzeyde)
- f) Makrolidler
- g) Florokinolonlar
- h) Tetrasiklinler
- ı) Hücre duvarı aktif ajanlar
- i) Rifampin
- j) Quinupristin/dalfopristin
- k) Linezolid

2.1.7.1. İnterensek (Doğal) Direnç

İnterensek direnç türe/cinse özgüdür. Enterokok türlerinin tamamında görülen kromozomal direnci ifade eder. Enterokoklar penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametaksazola, aminoglikozidlere (düşük düzeyde), polimiksinlere, monobaktamlara ve Quinupristin/dalfopristin'e karşı kromozomal olarak dirençlidir (61,62).

Aminoglikozitlere intrinsik olarak düşük düzey dirençleri vardır, burada iki mekanizma rol oynar. Birincisi enterokok hücre duvarının aminoglikozitlere geçirgenliğinin az olması, ikincisi de yalnızca *E.faecium*'da bulunan aminoglikozid modifiye edici enzim (6'-asetiltransferaz) tarafından aminoglikozidin inaktivasyonudur (63,64).

Enterokokların düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlerinin penisilin, ampisilin ve sefalosporinler dahil diğer betalaktam grubu antibiyotiklere karşı düşük afiniteye sahip olmasından dolayı penisilin ve ampisilin duyarlılıkları diğer streptokoklara göre 10 ile 1000 kat daha azdır. Enterokoklar beta-laktam antibiyotiklerle inhibe olurlar ama öldürülmezler (63,64).

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler. Enterokoklar in vitro olarak trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı bulunabilirler. Ancak enterokoklar ekzojen olarak folik asit kullanabildiklerinden in

vivo olarak etkisiz kabul edilmektedir. *E.faecalis* intrinsek olarak quinupristin/dalfopristine de dirençlidir. *E.gallinarum*, *E.casseliflavus* ve *E.flavescens*'te intrinsek olarak vankomisine düşük düzeyde direnç gösterirler (61,62).

2.1.7.2. Ekstresek (Kazanılmış) Direnç

Kazanılmış direnç genellikle DNA mutasyonları veya transpozon, plazmid veya patojenite adaları gibi yeni bir DNA segmentinin genoma transferi sonucu gelişir. En sık görülen mekanizma konjugasyondur. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yoluyla kazanılmış direncin en tipik örneğidir (52,65).

β -laktam Direnci

Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile β -laktam antibiyotiklere direnç kazanırlar. Direncin asıl mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilinin hücre içine girişinin azalmasıdır. Penisilin direnci, enterokoklarda bulunan PBP5 miktarı ile doğru orantılıdır ve sıklıkla *E.faecium* suşlarında görülür. PBP5 sentez yeteneğinin kaybının, penisiline oldukça dirençli suşların yüksek duyarlı olmasına neden olduğu gösterilmiştir (62,64).

β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin diğer mekanizması ise β -laktamaz üretimidir. β -laktamaz üreten enterokoklar nadir olarak izole edilmektedir. β -laktamaz üreten suşlar ilk olarak 1981 yılında ABD'de tanımlanmıştır (45).

β -laktamazların çoğu yüksek düzeyde gentamisin direnç genini de taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmıştır. Enterokoklardaki β -laktamazlar penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri hidrolize eder; penisilinaza dirençli penisilinleri, sefalosporinleri ve imipenemi etkilemez. (19,45,62,64).

Aminoglikozid Direnci

Bu grup antimikrobiklere karşı yüksek düzeyde direnç plazmid kaynaklı aminoglikozidlere etkili enzim üretimi veya ribozomal mutasyon ile oluşmaktadır. 6'asetiltransferaz–2' fosfotransferaz enzimi yüksek düzey gentamisin direncinden en fazla sorumlu olan enzimdir. Bu tür dirençte streptomisin haricinde diğer sık kullanılan aminoglikozidlere de çapraz direnç görülmektedir. Streptomisine etki eden 6'adenililtransferaz gibi enzimleri kodlayan gen içeren enterokoklar hücre duvarına etkili antimikrobikler ve aminoglikozidlerin tüm kombinasyonlarına dirençlidir.

Gentamisin direncinden sorumlu APH(2')-Id ve APH(2')-Ic enzimlerini üreten suşlarda bütün beta-laktam ve gentamisin sinerjisini elimine eder (4,65).

Kloramfenikol direnci

Enterokokların % 20-42'si kloramfenikole dirençli olup en sık sorumlu direnç mekanizması, plazmid üzerinde “*cat*” geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Ayrıca efluks mekanizması da dirençte rol alabilir (61).

Tetrasiklin direnci

Enterokokların tetrasiklin grubu antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu olan çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetM*, *tetO*, *tetN* ve *tetL* genleri bunlardan bazılarıdır. *tetM*, *tetO* ve *tetN* genleri tetrasiklinlerin ribozomlar üzerindeki etkisini inhibe eder. *tetL* geni ise mikroorganizma tetrasiklinle karşılaştığında aktive olur. Enterokokal bir plazmid üzerinde taşınır. Bu direnç geni tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan aktif transport sistemini kodlar (66).

Kinolon direnci

Direnç *gyrA* (giraz) ve *parC* (topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı gelişir. Enterokokal suşların çoğunluğu kinolonlara intermediate duyarlılık veya direnç gösterir (61).

Makrolid, Linkozamid ve B tipi Streptogramin direnci

Genellikle ribozomal RNA'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkili bulunmuştur. Bu metilasyonun sonucu olarak eritromisin ribozomlara bağlanamaz. Aynı mekanizma, klindamisinin enterokoklara karşı yüksek düzey direncinden de sorumludur. *ermB* geni, çeşitli plazmidler üzerinde Tn917 transpozonunun bir parçası olarak diğer mikroorganizmalara aktarılabilmektedir (61).

Oksazolidinon direnci

Linezolid, oksazolidinon grubunun yeni bir üyesi olup vankomisine dirençli enterokokların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Oksazolidinonlar 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Bu etkilerini ribozom alt ünitelerinin birleşerek, 70S ribozom kompleksini oluşturmasını engelleyerek yaparlar. Linezolid klinikte sınırlı kullanılmasına rağmen İngiltere, Avusturya ve Yunanistan'da

kısa zamanda linezolid dirençli enterokok suşlarının tespit edildiği bildirilmiştir (67,68).

Glikopeptit Direnci

Enterokoklarda peptidoglikan sentezi için iki D-Alanin molekülü, bir ligaz enzimi tarafından birbirine bağlanır. Oluşan D-ala-D-ala UDP-N-asetilmuramil-tripeptide eklenerek UDP-N-asetilmuramil-pentapeptidi oluşur. Daha sonra bu da transglikolizasyon yoluyla mevcut peptidoglikana eklenir. Glikopeptidler bu pentapeptidin D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanarak peptidoglikan sentezinin transglikolizasyon aşamasını inhibe ederek hücre duvarı sentezini engellerler. VRE ise farklı bir ligaz enzimi senteziyle D-ala-D-ala'daki alanin yerine laktat veya serin bağlayarak uç kısmın yapısını değiştirir ve D-ala-D-laktat veya D-ala-D-serin meydana gelerek vankomisin hücre duvarına bağlanma yeteneğinin azalmasına neden olarak vankomisine karşı direnç gelişir (45,62).

Enterokoklarda 2 tipte de glikopeptid direnci görülür. İlki doğal direnç mekanizmasıdır. Vankomisine düşük düzeyde direnç görülür. Diğeri ise kazanılmış dirençtir. Direnç sınıflandırması ligaz sentezleyen genlerin varlığına göre yapılmaktadır. Vankomisin direncinde tanımlanmış 6 fenotip vardır. Bunlar VanA, VanB, VanC, VanD, VanE ve VanG'dir. VanD, VanE ve VanG fenotiplerinin önemi tam olarak bilinmiyor. VanA ve VanB tipi direnç *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde tanımlanmış olup kazanılmış dirençlerdir. VanA, VanB, VanD tipi dirençte D-ala-D--laktat üretimi görülürken VanC, VanE ve VanG tipi dirençte D-ala-D-serin üretimi görülür (Tablo 2.3) (45,62,67,69).

Fenotipik Sınıflandırma

Fenotipik olarak Vankomisin direnci, Van A, Van B, Van C, Van D, Van E ve Van G olmak üzere 6 farklı tipte oluşabilir. VanA ve VanB direnç fenotipi, enterokoklarda önceden bulunmayan, yeni kazanılmış gen dizilerinden kaynaklanır ve ilk olarak *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır (45,62). VanA tipi dirençte; indüklenabilir yüksek seviyede vankomisin (MİK $\geq$ 64 $\mu\text{g/ml}$) ve teikoplanin direnci (MİK $\geq$ 16 $\mu\text{g/ml}$) görülür (45,62,70). VanB tipi dirençte ise; vankomisine daha ılımlı seviyede indüklenabilir direnç [Vankomisin MİK $\geq$ 32-64 $\mu\text{g/ml}$ (4-1000 $\mu\text{g/ml}$)] görülürken teikoplanine duyarlılık devam etmektedir. VanA direnç determinantları, tüm enterokok izolatları arasında transfer edilebilen büyük mobil bir elementte yerleşmişken, VanB sadece *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında görülür (40,55). VanC

tipi direnç ise *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*'da tanımlanmıştır. İntrinsik olarak düşük seviyede vankomisine direnç ve teikoplanine duyarlılık görülür (19,45,62,70).

Genotipik Sınıflandırma

VanA glikopeptit direnci

Bu direnç tipi kümes hayvanlarındaki koksidiyal enfeksiyonların, glikopeptidlerin (vankomisin, teikoplanin, avoparsin, ristosetin) ya da glikopeptid olmayan basitrasin, polimiksin B, robenidin gibi antimikrobiyal ilaçların tedavide kullanılmasıyla ortaya çıkmıştır. Vankomisin (MİK ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) ve teikoplanin (MİK ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$)'e karşı yüksek düzey direnç görülür. Başta *E. faecium* olmak üzere *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* ve bazı enterokok dışı türlerde gösterilmiştir. VanA tipi dirençten Tn1546 transpozonu sorumludur. Bu genle VanA geni kümesi taşınır. Tn1546 transpozonu 9 ayrı gen içerir. Bu genlerden ikisi transpozaz ve rezolvaz aktivitesi göstermektedir. Bu iki gen Tn1546'nın transpozisyonundan sorumlu iken transpozon üzerindeki diğer genler (VanR, VanS, VanH, VanA, VanX, VanY, VanZ) ise glikopeptid direncinden sorumludur. VanZ'nin glikopeptid direncindeki yeri tam olarak bilinmemekle birlikte teikoplanin direncinde rolü olduğu düşünülmektedir (62,64,71).

Bu VanA gen kümesi transfer edilen ve edilemeyen plazmidler ve kromozomlar üzerinde bulunabilmektedir. *E. faecium*'da ise bu gen plazmid üzerindedir. Ligaz özelliğinde olan VanA protein peptidoglikan prekürsörüne D-Ala-D-Lactat'ın bağlanmasını sağlamaktadır. D hidroksi asit dehidrogenaz olan VanH protein, D-Laktat'ın oluşumunu sağlamaktadır. VanX protein D-Ala-D-Ala'nın sentezini engellemektedir. Böylece normal pentapeptid oluşumunu engeller. VanR ve VanS proteinleri, VanHAX gen yığınlarının transkripsiyonunu düzenleyen iki regülatör sistemdir. VanS protein, vankomisin varlığını tespit eden bir sensör olarak görev yapar. VanS daha sonra VanR genini uyararak ve direnç için diğer VanH, VanA, VanX proteinlerinin sentezini başlatır. VanA fenotipleri hem vankomisin hem de teikoplaninin transkripsiyonunu indükler ve VanY ve VanZ genleri bunun devamlılığını sağlamaktadır. VanZ protein teikoplaninin MIC değerinin artmasını sağlarken vankomisinin MIC değerini artırmaz. VanA geni ilk olarak *E. faecium*'da bulunmuştur. Ancak daha sonraki yıllarda bu genin *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E.*

mundtii, *E.casseliflavus*, *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde de var olduğu tespit edilmiştir (72-80).

VanA tipi direnç en sık karşılaşılan dirençtir. Vankomisin tarafından yüksek, teikoplanin tarafından ise zayıf indüklenebilir özellikte, yüksek düzeyde bir dirençtir. İndüklenebilir VanA direncinde, yalnızca vankomisin varlığında oluşan PBP'lerin artışı sonucunda beta-laktam antibiyotiklere karşı bir duyarlılık meydana gelir. Bu da vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde vankomisin beta-laktam kombinasyonunun başarısını açıklamaktadır (81).

VanB glikopeptit direnci:

Bu direnç tipi VanB ligaz enzimi ile oluşur. VanB ligaz enzimi VanA ligaza yapısal benzerlik gösterir. Bu enzim D-ala-D-lac pentapeptidinin oluşumuna neden olur. Genellikle kromozomal yerleşimlidir, ancak transpozon ya da plazmid üzerinde de olabilir ve transfer edilebilir. Bu direnç tipinde vankomisine değişen oranlarda direnç (MİK $\geq 4-1024$ $\mu\text{g/L}$) görülebilirken, teikoplanine (MİK 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$) duyarlıdır. VanB tipi direnç genel olarak *E. faecalis*, *E. faecium* türlerinde görülürken nadiren de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve enterokok dışı bazı türlerde de saptanmıştır (62,64,71).

VanC glikopeptit direnci:

Vankomisine düşük düzeyde direnç (MİK 8-16 $\mu\text{g/ml}$) görülürken teikoplanine karşı direnç görülmez. Kromozomal olarak aktarılan bir direnç mekanizmasıdır. *E. gallinarum*'da VanC-1, *E. casseliflavus*'da VanC-2, *E. flavescens*'de VanC-3 genleri rapor edilmiştir. Yapısal olarak indüklenemez ve transfer edilemez bir direnç tipidir. D-ala-D-serin pentapeptidleri oluşturarak dirence neden olur (62,64,71).

VanD glikopeptit direnci:

Nadiren *E. faecium* türünde saptanmış bir direnç tipidir. VanD tipi dirençte orta düzeyde bir vankomisin (MİK 64-256 $\mu\text{g/ml}$) ve teikoplanin (MİK 4-32 $\mu\text{g/ml}$) direnci görülür. VanD geni kromozomal olarak aktarılır ve konjugasyon ile transfer edilemez. D,D dipeptidaz aktivitesi belirlenmemiştir ve karboksipeptidaz aktivitesi ise düşük düzeydedir. D,D-dipeptidaz aktivitesi bulunmamasına rağmen *vanD* gen kümesi *vanXD*, *vanRD*, *vanSD*, *vanHD* genlerini içermektedir (61,62).

VanE glikopeptit direnci:

Bu direnç tipinde vankomisin (MİK 16 µg/mL)'e düşük düzeyde direnç görülürken teikoplanin (MİK 0.5 µg/mL)'e duyarlıdır. VanE direnç fenotipi doğal VanC tipi direnç ile benzerlik gösterir. Diğer direnç tipleri ile de aminoasit dizilimlerinde benzerlikler gösterir. İndüklenebilir özelliktedir. Vankomisinle indüksiyon ile D-ala-D-ser terminal dipeptiti oluşur. *vanE* geni kromozomal olarak *E. faecalis* BM4405 izolatında tanımlanmıştır (5,49,53).

VanG glikopeptit direnci:

Bu direnç tipinde de yine vankomisin (MİK 16 µg/mL)'e düşük düzeyde direnç gözlenirken, teikoplanin (MİK 0.5 µg/mL)'e duyarlıdır. VanC ve VanE'de olduğu gibi D-ala-D-ser dipeptidleri oluşturarak dirence neden olur. Nadir görülen bir direnç tipidir. Bu direnç tipi *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Bu direnç tipinin transfer edildiğine dair bir bulgu elde edilememiştir (61,62, 70).

Vankomisine bağımlı enterokoklar (VDE):

Vankomisin tedavisi altındaki hastalardan alınan primer kültürlerde çoğunlukla VanB tipi dirence sahip enterokokların ürediği rapor edilmiştir. Bu izolatlar subkültürleri yapıldığında üreyememekte ancak vankomisin diski çevresinde veya vankomisin içeren besiyerlerinde üreyebilmektedirler. Vankomisin bağımlı *E. faecalis* ve *E. faecium* kan, idrar ve dışkıdan izole edilmiştir. İzole edilen hastalarda vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik tedavisi ve daha önce izole edilmiş bir VRE hikayesi mevcuttur. Bu VRE ile VDE "pulsed field gel elektroforezi" ile benzer DNA paterni göstermişlerdir. VanA ve VanB tarafından sentezlenen Dala- D-Lac vankomisin indüksiyonu sonucunda üretilmektedir. Diğer bir deyişle vankomisin eksikliğinde hücre yaşamı için ve hücre duvarı sentezi için gerekli olan komponentleri üretememektedir (41,62).

Tablo 2.3 VRE’de fenotipik ve genotipik özellikler (70)

Direnç Genotipi	Predominant Fenotip	Ekspresyon Şekli	Predominant Lokasyon	Transferabl Elemanlar	Alternatif Prekürsör	Bulunduğu Türler
<i>vanA</i>	Vanko ≥ 256 Teiko ≥ 32	İndüklenebilir	Plazmid Kromozom	Tnl546	D-Ala-D-Lac	<i>E.faeciu</i> , <i>E.faecalis</i> <i>E.hirae</i> , <i>E.avium</i> <i>E.durans</i> <i>E.mundtii</i>
<i>vanB</i>	Vanko 4- 1.000	İndüklenebilir	Kromozom (Plazmid)	Tnl547 Tn5382	D-Ala-D-Lac	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>
<i>vanC1</i> <i>vanC2</i> <i>vanC3</i>	Vanko 2-32 Teiko ≤ 1	Yapısal veya İndüklenebilir	Kromozom	?	D-Ala-D-Ser	<i>E.gallinarum</i> (<i>vanC1</i>) <i>E.casseliflavus</i> (<i>vanC2</i>) <i>E.flavescens</i> (<i>vanC3</i>)
<i>vanD</i>	Vanko 64-256 Teiko 4-32	Yapısal veya İndüklenebilir	Kromozom	?	D-Ala-D-Lac	<i>E.faecium</i>
<i>vanE</i>	Vanko = 16 Teiko = 0,5	?	Kromozom	?	D-Ala-D-Ser	<i>E.faecalis</i>

2.1.8. Epidemiyoloji

Enterokoklar yapısal karakterleri sayesinde zorlu çevre şartlarında yaşayabilir; kuşlar, böcekler, sürüngenler dahil hayvanlarda olduğu gibi insanlarda da gastrointestinal kanalda yüksek düzeyde bulunurlar.

Enterokoklar son yıllarda tüm dünyada giderek artan sıklıkta yol açtıkları hastane enfeksiyonu salgınları ile dikkatleri üzerlerine çekmişlerdir. İlk yapılan epidemiyolojik izlem çalışmaları, enterokokların hastadan hastaya ve hatta hastaneler arası yayılabilmesinde bu bakterilerin normal barsak florasında bulunmasının temel risk faktörü olduğunu, bu sebeple de insan dışkılarından en çok izole edilen tip olan *E.faecalis*'in hastane enfeksiyonlarında % 85-95'lik oran ile en yüksek insidansa sahip olan tür olduğunu, bunu barsak florasında ikinci sıklıkta görülen *E.faecium*'un % 5-10 oranı ile izlediğini göstermiştir (57,62).

Yakın zamanlara kadar enterokok enfeksiyonlarının, insanların kendi floralarından endojen olarak kaynaklandığı düşünülmekteydi. Ancak son zamanlarda, enterokoklar hastane enfeksiyonlarında 2. ya da 3. sıklıkta etken patojen olarak izole edilmeye başlanmıştır (58,82). Bunun sebebi olarak mikroorganizmanın hastane ortamında bulunan stetoskop, kapı tokmağı, yatak, komidin gibi cansız maddeler üzerinde uzun süre yaşayabilmesi örnek verilebilir. Ayrıca vankomisin, sefalosporin ve aminoglikozit gibi antibiyotiklerin, sık kullanımı hastane kaynaklı enterokok enfeksiyonlarının artışında rol oynayan faktörlerdendir (58,83). Enterokoklar hastanede kullanılan araçlar ve sağlık personeli aracılığıyla hastadan hastaya taşınarak hastane enfeksiyonlarına yol açabilmektedir (83-87).

Enterokok enfeksiyonlarının, insidansındaki artış, yalnız erişkin hastalarla sınırlı olmayıp yenidoğan, çocuk yoğun bakım ve hematoloji-onkoloji ünitelerinde de görülmektedir. 1999'da bu etkenin yeni doğan ünitelerinde üçüncü sıklıkta enfeksiyon etkeni olduğu bildirilmiştir (83,87).

Enterokokal enfeksiyonlar içerisinde *E. faecalis* ile oluşan enfeksiyonların oranı 10 kat fazladır. Ancak son yıllarda, VRE'lerin ortaya çıkması ile bu oran gittikçe düşmüş ve *E. faecium* izolatları ön plana çıkmaya başlamıştır. Bugün "National Nosocomial Infections Study System (NNIS)" sonuçlarına bakıldığında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde enfeksiyon etkeni olarak izole edilen enterokoklar içerisinde VRE'lerin oranının % 20'leri bulduğu görülmektedir (52,83). Enterokokal bakteriyemide yüksek

mortalite gözlenmesine rağmen bu tabloda nedensel ilişki oldukça şüphelidir. Bu hastaların çoğu ileri derecede düşkün, ağır hastalardır ve enterokokal bakteriyeminin bu durumun bir göstergesi olma olasılığı vardır. Birçok hastada enterokoklar polimikrobiyal enfeksiyonun bir parçasıdır ve tek başlarına morbidite ve mortaliteye etkilerini kestirmek oldukça zordur (85,87).

VRE suşlarının yaygınlaşması, Avrupa’da hayvanların beslenmesinde kullanılan glikopeptit olan avoparsin, ABD’de hospitalize hastaların gastrointestinal sistem kolonizasyonu ile ilişkilendirilmektedir (45,52,86,87). VRE ile kolonize ve/veya enfekte hastaların odalarındaki yüzeyler ve tıbbi aletler sıklıkla kontamine olur ve önemli bir VRE rezervuarı oluşturur. Hastada ishal varlığı söz konusu ise odasındaki kontaminasyonun daha yoğun olduğu belirtilmektedir (86,87). VRE ısıya, soğuğa ve diğer ortam koşullarına dirençli olduğu için, kolaylıkla cansız yüzeyler üzerinde günler, hatta haftalar boyu yaşamını sürdürebilir. VRE kolonizasyonu, taburcu olduktan sonra da haftalar/aylar boyunca devam edebilir (62,86,87).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kayseri bölgesinde Mayıs 2010 ayı ile Ağustos 2010 ayları arasında çeşitli hayvan türlerinin (tavuk, sığır, köpek) dışkı örnekleri çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Bu amaçla 100 adet sığır, 100 adet broyler, 100 adet yumurtacı tavuk ve 100 adet köpeğe ait dışkı örnekleri kullanılmıştır. Sığır örnekleri büyük işletmelerden, tavuklara ait örnekler ise broyler ve yumurtacı tavuk işletmelerinden alınmıştır. Köpeklere ait örnekler Büyükşehir Belediyesi köpek bakımevindeki köpeklerden rektal swab olarak alınmıştır.

3.1. KULLANILAN BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

Enterococcosel Broth

43 gr Enterococcosel Broth (Becton Dickinson, USA) 1 L distile su içinde çözüldü. 121°C'de 15 dk otoklavlandı. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 6 µg/ml oranında olacak şekilde Vankomisin ilave edildi. Steril plastik tüplere 10 ml Enterococcosel Broth olacak şekilde paylaştırıldı.

Enterococcosel Agar

56 gr Enterococcosel Agar (Becton Dickinson, USA) 1 L distile su içinde çözüldü. 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Dökülmeden hemen önce 6 µg/ml oranında olacak şekilde Vankomisin ilave edildi. Steril plastik petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Mueller Hinton agar

38 gr toz besiyeri (Becton Dickinson, ABD) 1L distile su içinde çözüldü. 121°C'de 15 dk otoklavlandı. Steril plastik petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Bu besiyeri E-test yöntemi ile glikopeptid direncinin saptanması için kullanıldı.

Columbia Blood Agar Base

39 gr toz besiyeri (Oxoid, İngiltere) 1 litre distile suda çözündürüldü ve sıcak su banyosunda tamamen eritildi. 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra 50 °C kadar soğutuldu ve üzerine % 7'lik steril defibrine koyun kanı ilave edildi. Besiyeri steril petrilere dökülerek hazırlandı.

PYR testi için besiyeri

30 gr toz besiyeri (Acumedia, ABD), 10 gr agar ve 100 mg pirro glutamik asit 1L distile su içinde çözüldü. 121 °C'de 15 dk otoklavlandı. Steril plastik petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Bu besiyeri suşların PYR aktivitesinin saptanması için kullanıldı.

Safra-eskülin besiyeri

30 gr Bile-esculin agar (Oxoid, İngiltere) 1L distile su içinde çözüldü. 121°C'de 15 dk otoklavlandı. Steril plastik tüplere konuldu. Eskülin hidrolizi testi yapmak için kullanıldı.

3.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Steril eküvyonlar ile dışkı ve rektal sürüntü örnekleri içinde 10 ml. Enterococcosel Broth bulunan tüplerde mikrobiyoloji laboratuvarına getirildi. Söz konusu tüpler 35°C'de, aerob ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzolasyon ve identifikasyon işlemleri Facklam ve Collins'in belirttiği yöntemle göre gerçekleştirildi (88).

3.3. KÜLTÜRLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Örnekler 24 saat 35°C'de, aerop ortamda inkübasyondan sonra 5 – 10 sn. vortekslendi. Süspansiyonun 0,1 ml.'si Enterococcosel Agara ekildi. Ekim yapılmış plaklar, 35°C'de, aerop ortamda 48-72 saat inkübe edildi. Üreme günlük olarak değerlendirildi (Şekil 3.1). Kahverengi-siyah koloniler (safra-eskülin pozitif) Gram boyama metodu ile boyandı. Gram pozitif kok görünümünde olan her bir farklı koloniden %5 koyun kanlı agara pasaj yapıldı. İnkübasyon sonrası kanlı agarda üreyen kolonilere Gram boyama,

katalaz, PYR ve eskülin hidrolizi testleri yapıldı. Klasik yöntemlerle enterokok olduğu saptanan suşlar daha sonra tür düzeyinde tanımlandı.



Şekil 3.1. Enterococcosel Agarda üreyen *Enterococcus* spp. kolonileri

3.3.1. Katalaz Testi

Kanlı agarda üremiş kolonilerden tahta çubuk yardımıyla alınarak temiz bir lam üzerine sürüldü. Üzerine taze hazırlanmış % 3'lük hidrojen peroksitten (H_2O_2) birkaç damla damlatıldı. Moleküler O_2 üretimi sonucu hızla hava kabarcıklarının oluşması pozitif sonuç olarak kabul edildi (89).

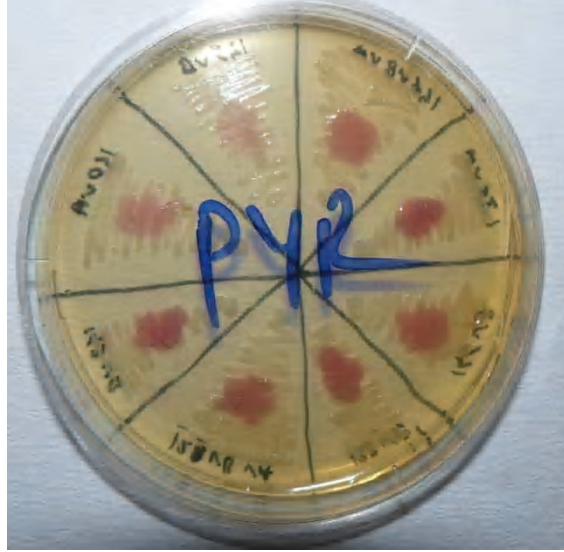
3.3.2. PYR Testi

PYR test besiyerine enterokok şüpheli kolonilerden ekildi ve 18-24 saat 35 °C'de inkübe edildi. Daha sonra üreyen kolonilerin üzerine % 0,015 p-dimetylaminocinnamaldehyde içeren ayıraçtan 1-2 damla döküldü. PYR'nin hidrolizi ile oluşan beta naphthylamine ile ayıracın reaksiyona girmesi sonucu pembe-menekşe moru renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3.2). Rengin ayraç rengi olan sarı renk olarak kalması ise negatif olarak değerlendirildi (90).

3.3.3. Eskülin Hidrolizi Testi

Safra-eskülin besiyerine enterokok şüpheli suşların ekimi yapıldı ve 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Besiyerinde oluşan siyah renkli koloniler eskülin hidrolizi pozitif olarak değerlendirildi (89).

Katalaz negatif, PYR testi pozitif ve eskülin hidroliz testi pozitif bulunan suşlara ileri identifikasyon ve duyarlılık testleri yapıldı.



Şekil 3.2. PYR Testi görünümü

3.3.4. Rapid ID 32 Strep Sistemi

Suşlar Mini api cihazında Api Rapid ID 32 Strep (Biomeri  ux, Fransa) kitiyle t  r düzeyinde tanımlandı.

Bu kit 32 kuyucuk içermekte ve bu kuyucuklarda biyokimyasal testler dehidrate formda bulunmaktadır. Bu testlerden 7 tanesi oksidaz reaksiyonları (β -glukozidaz, β -glukuronidaz, β -galaktozidaz için iki farklı substrat, α -galaktozidaz, N-asetil- β -glukozaminidaz ve β -mannozidaz), 17 tanesi karbonhidrat fermentasyon reaksiyonları (riboz, mannitol, sorbitol, laktoz, trehaloz, raffinoz, sükroz, L-arabinoz, D-arabitol, siklodekstrin, glikojen, pullulan, maltoz, melibioz, melezitoz, metil- β -D-glukopiranozid ve tagatoz), 3 tanesi arilamidaz reaksiyonları (alanil-fenilalanil-prolin, piroglutamik asit ve glisiltryptofan), 1 fosfataz reaksiyonu (alkalin fosfataz) ve 4 tanesi de klasik biyokimyasal testlerden (arjinin dihidrolaz, asetoin üretimi, hipp  rat hidrolizi ve üreaz) oluşmaktadır.

Kanlı agarda 18-24 saatlik inkübasyonla taze üretilen enterokok su  larından 2 ml'lik steril su içeren tüplerin içerisine McFarland 4,0 bulanıklık olacak şekilde süspansiyonu hazırlandı. Her bir kuyucuğa bu süspansiyondan 55 μ l dağıtıldı. 37 $^{\circ}$ C'de 4 saat inkübe edildi. Daha sonra bir ATB 1545 bilgisayarı bağlı olan ATB 1520 (API-Biomeri  ux)

cihazında okutuldu. Tanımlama bilgisayardaki ATB Plus adlı programın rapid ID 32 Strep V 1.0 versiyonuyla yapıldı.

3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

3.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Bakteri süspansiyonu 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlandıktan sonra Mueller-Hinton agar (Acumedia, Baltimore) içeren petri yüzeylerine steril pamuklu çubuk kullanılarak sürüldü. Ampisilin (10 µg) (Oxoid, UK), gentamisin (10 µg) (Oxoid, UK), siprofloksasin (5 µg) (Becton Dickinson, USA), vankomisin (30 µg) (Becton Dickinson, USA), teikoplanin (30 µg) (Becton Dickinson, USA), streptomisin (10 µg) (Becton Dickinson, USA), tetrasiklin (30 µg) (Becton Dickinson, USA), eritromisin (15 µg) (Becton Dickinson, USA), kloramfenikol (30µg) (Becton Dickinson, USA), penisilin (10 IU) (Becton Dickinson, USA), linezolid (30µg) (Becton Dickinson, USA), qoinupristin/dalfopristin (4,5µg/10,5µg) (Bioanalyse) diskleri Mueller- Hinton agar yüzeyine yerleştirildi. Plaklar 16- 18 saat 35±2 °C’de aerob ortamda inkübe edildi. Disklerin zon çapları ölçülerek CLSI-2010 standartlarına göre suşların duyarlılık durumları yorumlandı (91).

3.4.2. E- Test Yöntemiyle Glikopeptid Direncinin Belirlenmesi

Tüm şüpheli VRE izolatlarında vankomisin ve teikoplanine duyarlılık E-test yöntemi ile belirlendi. E-test şeritleri (Biomerieux, Solna, Sweden) kullanım zamanına kadar - 20°C’de saklandı. Kullanımdan önce çıkarılıp bir müddet oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Kanlı agar besiyerine pasaj yapılmış 18-24 saatlik saf taze kültürden steril SF içinde turbidometre ile 0,5 Mc Farland standart bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Eküvyon çubuk yardımıyla Mueller Hinton agar besiyeri üzerine homojen bir şekilde ekim yapıldı. Yaklaşık 15 dk besiyerinin kuruması beklendikten sonra besiyerlerine vankomisin ve teikoplanin içeren E-test şeritleri yerleştirildi. 35°C de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra elips şeklindeki inhibisyon alanının şeritle kesiştiği nokta MİK değeri olarak belirlendi (Şekil 3.3). CLSI-2010 önerilerine göre vankomisin MİK değeri ≤4 µg/ml olan suşlar duyarlı, 8-16 µg/ml olan suşlar orta derecede duyarlı ve ≥32 µg/ml olan suşlar dirençli olarak kabul edildi. Teikoplanin MİK değeri ≤8 µg/ml olan suşlar duyarlı, 16 µg/ml olan suşlar orta derecede duyarlı, ≥32 µg/ml olan suşlar dirençli olarak kabul edildi (92).

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında örneklerin kültürlerinden izole edilip tür düzeyinde tanımlanan VRE suşları moleküler çalışma için -70°C’de mikrobanklarda saklandı.

3.4.3 Çoğul Direnç

İki yada daha fazla antibiyotik grubuna aynı anda dirençli bulunan izolatlar çoğul ilaç dirençli olarak kabul edildi.



Şekil 3.3. *Enterococcus* spp. izolatının disk difüzyon ve E-Test görünümü

3.5. VRE SUŞLARINDA VANKOMİSİNE DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Glikopeptid direnci saptanan hayvansal orijinli Vankomisine Dirençli Enterokokların *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genleri yönünden moleküler analizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile yapıldı (92).

3.5.1 PZR yönteminin uygulanması

Çalışma yapılmadan önce -70°C’de saklanan VRE suşlarını canlandırmak amacıyla kanlı agara pasajları yapılarak 35°C’de etüvde 18-24 saat süreyle inkübe edildi. Kontamine olmayan saf koloniler ikinci kez pasajları yapılarak 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. Kanlı agara pasajları yapılarak elde edilen saf VRE suşlarının PZR yöntemi ile moleküler analizi 4 aşamada gerçekleştirildi.

Aşamalar:

3.5.2. Nükleik asit izolasyonu

Suşlar -70 °C’ de mikrobank®’lardan çıkarılarak kanlı agarda iki kez subkültürleri yapıldı.

Kit içeriği

- Lysis Solüsyonu: 40 ml kullanıma hazır solüsyon
- Presipitasyon Solüsyonu: 10X konsantrasyonda 8 ml solüsyon
- NaCl Solüsyonu: 10 ml 1,2 M Sodyum Klorür

3.5.3. Bakteri kültürlerinden nükleik asit izolasyon prosedürü

1. Steril ependorf tüpleri ependorf sporlarına dizildi. Her bir ependorf tüpüne 300 µL steril distile su eklendi. Tüp içine bakteri kolonileri konularak 15 saniye vortekslendi.
2. Elde edilen solüsyon 7500 µm de 10 dk santrifüj edildi.
3. Tüplerin üzerindeki sıvı uzaklaştırılıp dibinde biriken bakteri tortusu 200 µL TE (Tris-EDTA) Buffer (PH 7.4) ile sulandırıldı.
4. 200 µL TE Buffer içerisindeki bakterilerin üzerine 400 µL Lysis solüsyonu ilave edildikten sonra 15 saniye vortekslendi.
5. 65 °C’de etüvde 5 dakika inkübe edildi. Kapakta biriken damlacıkların tabana inmesi için kısa süreli santrifüj edildi.
6. Tüplere 600 µL kloroform ilave edildikten sonra 3-5 kez tüpler alt üst edildi.
7. Tüplerdeki karışımın tamamı 10000 rpm.de 2 dakika santrifüj edildi.
8. 720 µl steril distile su 80 µL (10 x konsantre solüsyon) presipitasyon solüsyonu ile karıştırılarak presipitasyon solüsyonu hazırlanmalı.
9. Santrifüj edilen tüplerin üstünde tabaka halindeki aköz kısım steril bir tüpe alınarak üzerine 800 µL presipitasyon solüsyonu eklendi ve oda ısısından 1-2 dakika alt üst edildi. Sonra 10000 rpm.de 2 dakika santrifüj edildi.
10. Tüplerin içerisindeki solüsyonun üst kısmı tamamen uzaklaştırıldı. DNA pelleti 100 µL 1.2 M NaCl ile sulandırıldı ve tamamen çözülünceye kadar vortekslendi.
11. 1.2 M NaCl eklenen DNA pelleti üzerine 300 µL % 96 ‘lık etanol eklendi ve -20 °C de 10 dakika bekletildi.

12. Tüpler 10000 rpmde 3-4 dakika santrifüj edilip üst kısımdaki etanol uzaklaştırıldı. Pellet tekrar % 70 'lik etanol ile karıştırıldı. Tekrar 10000 rpm de 3-4 dakika santrifüj edilip üst kısım uzaklaştırıldı. Dipteki kısım 100 µL steril distile su ile karıştırılarak saf nükleik asit elde edildi. PZR çalışması için -20 °C de saklandı.

3.5.4. DNA Amplifikasyonu

Vankomisine Dirençli Enterokokların *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genleri yönünden moleküler analizi Dutka-Malen et al. (92) kullandığı primer dizilimi ve PZR prosedürüne göre yapıldı. Farklı olarak Kariyama et al. (93) 'da belirtilen *rrs* (16S rRNA) primer dizilimi genus tayini amacıyla kullanıldı.

***vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* Genlerinin Tespiti İçin Amplifikasyon Karışımı:**

- 10X PZR Buffer	5 µL
- 25 mM MgCl ₂	4 µL
- 10 mM dNTP karışımı	2 µL
- <i>vanA</i> Primer F (5' - GGG AAA ACG ACA ATT GC - 3')	0,5 µL
- <i>vanA</i> Primer R (5' - GTA CAA TGC GGC CGT TA - 3')	0,5 µL
- <i>vanB</i> Primer F (5' - ATG GGA AGC CGA TAG TC - 3')	0,5 µL
- <i>vanB</i> Primer R (5' - GAT TTC GTT CCT CGA CC - 3')	0,5 µL
- <i>vanC1</i> Primer F (5' - GGT ATC AAG GAA ACC TC - 3')	0,5 µL
- <i>vanC1</i> Primer R (5' - CTT CCG CCA TCA TAG CT - 3')	0,5 µL
- <i>vanC2</i> Primer F (5' - CTC CTA CGA TTC TCT TG - 3')	0,5 µL
- <i>vanC2</i> Primer R (5' - CGA GCA AGA CCT TTA AG - 3')	0,5 µL
- <i>rrs</i> (16S rRNA) Primer F (GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C -3')	0,5 µL
- <i>rrs</i> (16S rRNA) Primer R (TCG TTG CGG GAC TTA ACC CAA C -3')	0,5 µL
- <i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,2 µL
- Distile su	28,8 µL

3.5.5. Testin uygulanması

1. Amplifikasyon için kullanılacak buffer, $MgCl_2$, dNTP, Primerler ve *Taq* DNA Polimeraz $-20^{\circ}C$ 'lik derin dondurucudan çıkarıldı. *Taq* DNA Polimeraz çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
2. Örnek sayısı ve pozitif kontrol sayısı kadar PZR miksi tek ependorf tüpüne hazırlandı ve 0.2 ml'lik PZR tüplerine 45 μ L dağıtıldı.
3. Pozitif kontrol ve suşlardan elde edilmiş DNA, 5 μ L 0,2 mL'lik PZR tüplerine dağıtıldı.
4. 0.2 ml'lik PZR tüpleri 'thermal cycler' (Techne Touchgene Gradiend) cihazına yerleştirildi.
5. Örneklerdeki nükleik asit 'thermal cycler' cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı:

$94^{\circ}C$ 'de	2 dakika	}	30 döngü
$94^{\circ}C$ 'de	1 dakika		
$54^{\circ}C$ 'de	1 dakika		
$72^{\circ}C$ 'de	1 dakika		
$72^{\circ}C$ 'de	10 dakika		

6. 150 ml TBE 1X tamponu içerisinde 2,25 g agaroz ısıtılarak eritildi. El yakmayacak kadar soğuduktan sonra 3 μ L 'ethidium bromide' katılarak yatay jel elektroforez tankına döküldü.
7. Çoğaltılan örneklerden 10'ar μ L alıp üzerine 5'er μ L yükleme boyası karıştırılarak jele yüklendi.
8. Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 1 saat yürütüldü.
9. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 732, 635, 822 ve 439 bazçift (bp) uzunluğunda olan pozitif kontroller ile aynı bölgede bant verdiğinde sırasıyla *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* için pozitif olarak kabul edildi.

10. Kontrol suşları olarak; *E. feacalis* WHO3 (*vanA* pozitif), *E. feacalis* WHO14 (*vanB* pozitif), *E. gallinarum* CECT 970 (*vanC1* pozitif), *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC2* pozitif) kullanıldı.

4. BULGULAR

Kayseri bölgesinde Mayıs 2010 - Ağustos 2010 ayları arasında 100 adet sığır, 100 adet broyler, 100 adet yumurtacı tavuk ve 100 adet köpeğe ait toplam 400 dışkı örneği çalışmaya alınmıştır. Bu örneklerden 68 adet Enterokok izolatu elde edilmiş olup hayvan türlerine göre izolatların dağılımı Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Enterococcus* spp. izolasyon oranları

Hayvan Türü	İncelenen Örnek Sayısı	Pozitif Örnek Sayısı
Broyler	100	3
Yumurtacı Tavuk	100	45
Sığır	100	9
Köpek	100	11
Toplam	400	68

Çeşitli hayvan türlerinden elde edilen 68 adet izolatın 63 adetinin (% 92,64) *E.faecium*, 3 adetinin (% 4,41) *E.gallinarum*, 2 adetinin de (% 2,94) *E.casseliflavus* türlerine ait olduğu tespit edilmiş olup Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Toplam 63 adet tespit edilen *E.faecium* izolatının 44 adetinin (% 69,84) yumurtacı tavuk, 8 adetinin (% 12,69) sığır, 8 adetinin (% 12,69) köpek, 3 adetinin (% 4,76) broylere ait olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.2. *Enterococcus* spp. izolatlarının tür düzeyinde ve örneklerle göre dağılımı

İzolat Türü	Hayvan Türü				Toplam
	Broiler	Yumurtacı Tavuk	Sığır	Köpek	
<i>E. faecium</i>	*3 (4,41)**	44 (64,70)	8 (11,76)	8 (11,76)	63 (92,64)
<i>E. gallinarum</i>	-	-	1 (1,47)	2 (2,94)	3 (4,41)
<i>E. casseliflavus</i>	-	1 (1,47)	-	1 (1,47)	2 (2,94)
Toplam	3 (4,41)	45 (66,17)	9 (13,23)	11 (16,17)	68 (100)

* *Enterococcus* spp. izole edilen örnek sayısı

**Toplam pozitif örnek sayısına göre % değeri

Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

İzolatların disk difüzyon yöntemiyle 64 (% 94)’ü qoinupristin/dalfopristine, 16 (% 23,53)’ı eritromisine, 16 (% 23,53)’ı tetrasikline, 10 (% 14,70)’u vankomisine, 9 (%13,33)’u siprofloksasine, 7 (% 10,2)’i streptomisine, 5 (% 7,3)’in teikoplanine dirençli olduğu saptanmıştır. İzolatların tümünün ampisilin ve penisiline duyarlı olduğu, linezolute bir ve kloramfenikole üç adet izolatın da orta duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. *Enterococcus* spp. izolatlarının disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	<i>E.faecium</i> (n=63)			<i>E.casseliflavus</i> (n=2)			<i>E.gallinarum</i> (n=3)			TOPLAM (n=68)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
VAN 30 µg	5 %7,9	0 %0	58 %92,6	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	0 %0	0 %0	10 %14,7	0 %0	58 %85,2
TEC 30 µg	5 %7,9	0 %0	58 %92,06	0 %0	0 %0	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	5 %7,3	0 %0	63 %92,6
CIP 5 µg	9 %14,2	35 %55,5	19 %30,5	0 %0	1 %50	1 %50	0 %0	3 %100	0 %0	9 %13,3	39 %57,3	20 %29,4
LNZ 30 µg	0 %0	1 %1,5	62 %98,4	0 %0	0 %0	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	0 %0	1 %1,4	67 %98,5
SYN 4,5/10,5µg	60 %95,2	1 %1,5	2 %3,1	2 %100	0 %0	0 %0	2 %66,6	1 %33,3	0 %0	64 %94,1	2 %2,9	2 %2,9
AM 10 µg	0 %0	0 %0	63 %100	0 %0	0 %0	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	0 %0	0 %0	68 %100
TE 30 µg	15 %23,8	2 %3,1	46 %73,01	1 %50	0 %0	1 %50	0 %0	1 %33,3	2 %66,6	16 %23,5	3 %4,4	49 %72,05
CN 120 µg	2 %3,17	0 %0	61 %96,8	0 %0	0 %0	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	2 %2,9	0 %0	66 %97,05
S 300 µg	6 %9,5	1 %1,5	56 %88,8	0 %0	0 %0	2 %100	1 %33,3	0 %0	2 %66,6	7 %10,2	1 %1,4	60 %88,2
C 30 µg	0 %0	3 %4,7	60 %95,2	0 %0	0 %0	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	0 %0	3 %4,4	65 %95,5
E 15 µg	15 %23,8	38 %60,3	10 %15,8	1 %50	1 %50	0 %0	0 %0	1 %33,3	2 %66,6	16 %23,5	40 %58,8	12 %17,6
P 10 IU	0 %0	0 %0	63 %100	0 %0	0 %0	2 %100	0 %0	0 %0	3 %100	0 %0	0 %0	68 %100

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

VAN : Vankomisin , TEC : Teikoplanin , CIP : Siprofloksasin,

LNZ : Linezolid , SYN : Quinupristin/Dalfopristin , AM : Ampisilin

TE : Tetrasiklin , CN : Gentamisin , S : Streptomisin

C : Kloramfenikol , E : Eritromisin , P : Penisilin

Buna göre antibiyotik direnç oranları aşağıda sıralanmıştır:

Yumurtacı tavuklardan elde edilen 45 izolatın; qoinupristin/dalfopristine % 95,5, eritromisine % 26,6, siprofloksasine % 13,3, tetrasikline % 26,6, streptomisine % 11, gentamisine % 2,2, vankomisine % 2,2 oranında dirençli olduğu saptanmıştır.

Broylerden elde edilen üç izolatın hepsinin qoinupristin/dalfopristine, eritromisine ve tetrasikline, iki izolatın siprofloksasine, bir izolatın gentamisine, vankomisine ve teikoplanine dirençli olduğu saptanmıştır.

Sığırlardan elde edilen 9 izolatın hepsinin qoinupristin/dalfopristine dirençli olduğu, birer izolatın da vankomisine, siprofloksasine, tetrasikline ve eritromisine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Köpeklerden elde edilen 11 izolatın 9'unun qoinupristin/dalfopristine, 7' sinin vankomisine, 4'ünün teikoplanine, iki adetinin de streptomisine dirençli olduğu belirlenmiştir.

Buna göre disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılığı çalışılan 68 Enterokok izolatının 32'i (% 47) çoğul ilaç direncine sahip olduğu saptanmıştır. Söz konusu izolatların 28'i *E.faecium*, 2'i *E. gallinarum*, 2'i de *E.casseliflavus* türlerine aittir. Çoğul ilaç dirençli izolatların 19'u (% 59,3) yumurtacı tavuklardan, 7'si (% 21,8) köpeklerden, üçü (% 9,3) sığırlardan ve üçü (% 9,3) broylerlerden elde edilmiştir. Çoğul ilaç dirençli suşların dirençli oldukları antibiyotikler ve oranları Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Çeşitli kaynaklardan elde edilen toplam 68 adet Enterokok izolatı E-test yöntemi ile glikopeptid direnci yönünden test edilerek toplam 10 adet izolatta vankomisine ve 5 adet izolatta da teikoplanine direnç varlığı bulunmuştur. *E.faecium* suşlarının vankomisin ve teikoplanin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ile MİK aralıkları ve duyarlılık oranları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Çoğul ilaç dirençli *Enterococcus* spp. izolatlarının dirençli oldukları antibiyotikler ve oranları

SUŞLAR (n)	DİRENÇLİ SUŞ SAYISI (%)	ANTİBİYOTİKLER
<i>E.faecium</i> (63)	3(4,41)	SYN, CIP
	3(4,41)	SYN, E
	2(3)	SYN, TE
	1(1,47)	SYN, VAN, TEC
	1(1,47)	SYN, S
	3(4,41)	VAN, TEC
	1(1,47)	SYN, TE, E
	1(1,47)	SYN, CIP, E
	2(3)	SYN, CIP, TE
	3(4,41)	SYN, TE, E
	1(1,47)	SYN, S, E
	4(3)	SYN, TE, S, E,
	1(6,4)	SYN, CIP, CN, TE,
	1(1,47)	SYN, CIP, CN, TE, TEC, E, VAN
	1(1,47)	SYN, VAN, TEC, CIP, TE, E
<i>E.casseliflavus</i> (2)	1(50)	VAN, SYN
	1(50)	VAN, TE, E, SYN
<i>E.gallinarum</i> (3)	1(33,3)	VAN, SYN
	1(33,3)	VAN, SYN, S

VAN : Vankomisin

TEC : Teikoplanrn

CIP : Siprofloksasin

SYN : Qoinupristin/Dalfopristin

TE : Tetrasiklm

CN : Gentamisin

S : Streptomisin

C : Kloramfenikol

E : Eritromisin

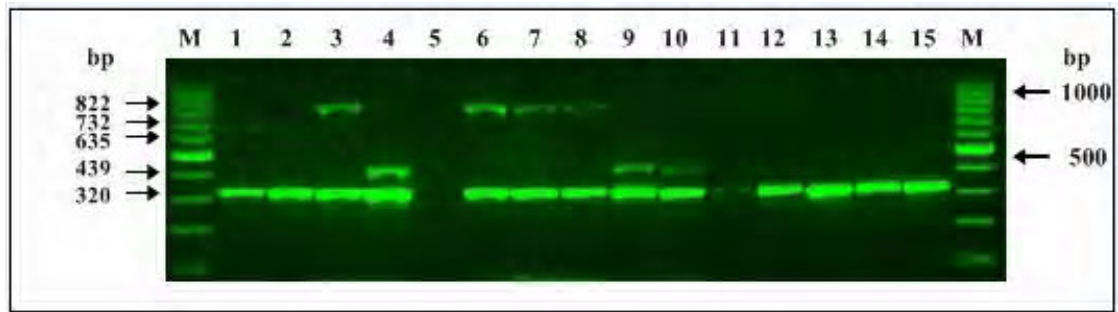
Tablo 4.5. E-test yöntemi ile *E.faecium* izolatlarının vankomisin ve teikoplanin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, MİK aralıkları ve duyarlılık oranları

Antibiyotik	MİK (µg/ mL)			Duyarlılık oranları	
	Aralık	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Dirençli
Vankomisin	2- 256	4	4	58	5
Teikoplanin	0.125- 32	0.50	1	58	5

MİK: Minimal inhibitör konsantrasyon

Moleküler Analiz Sonuçları

Glikopeptid direnci E-test yöntemiyle belirlenen 10 adet VRE suşunun *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genleri yönünden moleküler analizi sonucunda; tüm izolatların *vanA* ve *vanB* geni taşımadığı bunun yanında 3 adet suşun *vanC1*, 2 adet suşun da *vanC2* geni taşıdığı tespit edilmiştir. *vanC1* geni taşıyan 3 adet VRE suşun 2 adetinin köpeklerden elde edilen suşlar olduğu, 1 adetinin de sığırdan elde edilen suş olduğu tespit edilmiştir. *vanC2* geni taşıyan 2 adet VRE suşunun 1 adetinin köpekten elde edilen suş olduğu, 1 adetinin de yumurtacı tavuktan elde edilen suş olduğu belirlenmiştir. Yapılan moleküler çalışmada 5 adet VRE suşunun ise *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2* genlerinden hiçbirini taşımadığı tespit edilmiştir. E-test ve moleküler analizlerin ışığında VRE suşlarının fenotipik ve genotipik karakterlerini içeren bilgiler Tablo 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.1. Multipleks PZR reaksiyonu ile elde edilen ampikonların elektroforezi sonucu oluşan jeldeki bant görüntüleri. **M:**Marker, **1:** *vanA* (732 bp) Pozitif Kontrol, **2:** *vanB* (635 bp) Pozitif Kontrol, **3:** *vanC1* (822 bp) Pozitif Kontrol, **4:** *vanC2* (439 bp) Pozitif Kontrol, **5:** Negatif Kontrol, **6-10:** Pozitif İzolatlar, **11-15:** Negatif İzolatlar, **320bp:** Genus Spesifik Gen *rrs* (16S rRNA)

Tablo 4.6. VRE İzolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri

Suş No	Köken	Tür	VAN MİK ₉₀	TEC MİK ₉₀	Glikopeptit Dışı Antibiyotik Dirençliliği	Genotip
1	Köpek	<i>E.faecium</i>	256	32	SYN	-
2	Köpek	<i>E.faecium</i>	256	32	-	-
3	Köpek	<i>E.faecium</i>	256	32	-	-
4	Köpek	<i>E.faecium</i>	256	32	-	-
5	Broyler	<i>E.faecium</i>	256	32	SYN, CIP, TE	-
6	Sığır	<i>E.gallinarum</i>	256	1	SYN	<i>vanC1</i>
7	Köpek	<i>E.gallinarum</i>	256	1	-	<i>vanC1</i>
8	Köpek	<i>E.gallinarum</i>	256	1	SYN,S	<i>vanC1</i>
9	Köpek	<i>E.casseliflavus</i>	256	1	SYN	<i>vanC2</i>
10	Yumurtacı Tavuk	<i>E.casseliflavus</i>	256	1	SYN, TE, E	<i>vanC2</i>

- : Negatif

MİK₉₀: Minimal inhibitör konsantrasyon

CIP : Siprofloksasin,

SYN : Qoinupristin/Dalfopristin

TE : Tetrasiklin

S : Streptomisin

E : Eritromisin

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enterokoklar, Gram pozitif, katalaz negatif koklar olup, ekosistem içinde toprakta, suda, bitkilerde, gıdalarda, hayvanların ve insanların deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemlerinin doğal florasında bulunurlar. Enterokok'lar fırsatçı patojenler olup beslenme ve bakım şartlarının uygun olmadığı hayvanlarda sepsisemi, üriner sistem infeksiyonuna, endokarditlere, ishale ve otitis eksternaya neden olmaktadır. Enterokok'lar insanlarda ve özellikle immun sistemi zayıf olan bireylerde üriner sistem infeksiyonlarına, endokarditlere, menenjitlere, bakteriyemiye, cerrahi yara infeksiyonlarına sebep olurlar (94,95). Enterokoklar günümüzde hastane infeksiyonlarında giderek artan izolasyon oranları ve çoklu antibiyotik direnç özellikleri nedeni ile önemli ve sorunlu Gram pozitif bakteriler arasında sayılmaya başlanmıştır (96).

Son yıllarda zoonotik infeksiyon ajanlarında antimikrobiyellere karşı gittikçe artan direnç gözlenmeye başlanmıştır. Hayvanlarda hem büyümeyi desteklemesi amacıyla, hem de insanlarda olduğu gibi infeksiyonların tedavisinde antimikrobiyal ajanların kullanımının artması sonucunda ortaya çıkan dirençli genler, antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların izolasyonuna neden olmuştur (97). Söz konusu patojenler ile oluşan infeksiyonlarda tedaviye oldukça dirençli ve tehlikeli bir hal almıştır. Hayvanlarda avoparsin kullanımının hayvanların gastrointestinal sistemlerinden gıda zinciri ile insanlara VRE geçişlerinin olabileceği düşünülmektedir (79,98).

Yurtdışında 1997'den 2007 yılına kadar kanatlı çiftliklerinde dışkı örneklerinden yapılan çalışmalarda en sık *E.faecium* izole edilmiş ve bu suşlarda vankomisin direnci yıllar içerisinde % 57'den % 4'e kadar azaldığı bildirilmiştir. Vankomisin direnç

oranının yüksek olduğu çalışmaların avoparsin kullanımının yasaklanmasından hemen sonra yapıldığı belirlenmiştir (99-103).

Son yıllarda Portekiz ve Litvanya’da kanatlı barsak içeriklerinden yapılan çalışmalarda en sık *E.faecium* ve *E.faecalis* izole edilmiş ve bu suşlarda glikopeptid direnci saptanamamıştır (104,105).

Kaya ve ark. (97), 2007 yılında yaptıkları çalışmada tavuklarda vankomisin ve teikoplanin dirençli enterokok suşu bulamadıklarını bildirmişlerdir.

Ülkemizde ve diğer ülkelerde avoparsinin büyütme faktörü olarak kullanımının yasaklanmasından sonra zamanla enterokoklarda vankomisin direncinin önemli ölçüde azaldığı görülmektedir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Dünyada ve ülkemizde kanatlılarda yapılan VRE çalışmaları

ÜLKE (YIL)	Türler %	Fenotip	Genotip	Özellikler	Kaynak (No)
Hollanda (1997)	<i>E. faecium</i> % 57	VanA	<i>vanA</i>	50 broyler 25 yumurtacı tavuk dışkısı	(99)
Kore (1998-1999)	<i>E. faecium</i> <i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> % 4,8	VanA VanC	<i>vanA</i> <i>vanC1</i> <i>vanC2</i>	352 adet kanatlı dışkısı	(100)
Malezya (2005)	<i>E. faecium</i> <i>E.faecalis</i> <i>E.gallinarum</i> <i>E.casseliflavus</i> % 4,5	VanA VanC	<i>vanA</i> <i>vanC1</i> <i>vanC2</i>	200 adet kanatlı dışkısı	(102)
İsveç (2007)	<i>E. faecium</i> % 18,3	VanA	<i>vanA</i>	60 adet sekum içeriği	(103)
Türkiye (2001)	<i>E.faecalis</i> <i>E.gallinarum</i> % 13,6	VanA VanC		Ankara çevresindeki kanatlı işletmelerinden dışkı örneği	(106)
Türkiye (2005)	<i>E. faecium</i> % 0,4	VanA		400 kanatlı dışkı örneği (Ankara- Kırıkkale)	(107)
Türkiye (2010)	<i>E. faecium</i> % 0,4	VanA	<i>vanA</i>		(108)

Bu çalışmada broyler ve yumurtacı tavuklardan elde edilen toplam 48 adet *Enterococcus* spp. izolatının 47 adetinin *E.faecium* olması yukarıda belirtilen yurtdışı ve yurtiçi çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmada *E.faecium* ve *E.casseliflavus* dışında türlerin tespit edilememesinin nedeni, kullanılan buyyon ve katı besi yerinin içerisine 6 µg/ml oranında katılan vankomisin seçici özelliğinden olduğu değerlendirilmektedir. Bu çalışmada yumurtacı tavuk örneklerinden tespit edilen 1 adet *vanC2* taşıyan *E.casseliflavus*, Kore’de 1998-1999 yılları arasında yapılan çalışma (100) ve Malezya’da 2005 yılında yapılan çalışma (102) sonuçları ile uyum sağlamaktadır.

Avrupa’da 1996-2009 yılları arasında köpek dışkı örneklerinde yapılan çalışmalarda VRE oranının % 48’den % 12’e kadar azaldığı bildirilmiştir. Bu suşların çoğunluğunun *vanA* geni içeren *E.faecium* ve *vanC1* geni içeren *E. gallinarum* olduğu belirlenmiştir (109-111).

İtalya, Danimarka ve ülkemizde İzmir’de 2005-2006 yıllarında köpek dışkı örneklerinde yapılan çalışmalarda VRE izolatı bulunamamıştır (112-114).

Ülkemizde 2001 yılında Çelik (106)’in Ankara’da köpek dışkı örneklerinde yapmış olduğu çalışmada izole edilen 14 *Enterococcus* spp. izolatının 2’sinin (% 14,3) vankomisine dirençli olduğunu ve bunlardan birinin *E.faecalis* VanA, diğerinin de *E.faecium* VanB fenotipine sahip olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada köpek dışkı örneklerinde 8 adet *E.faecium*, 2 adet *E. gallinarum* ve 1 adet *E.casseliflavus* tespit edilmesi yukarıda köpek dışkı örnekleri ile yapılan çalışmaların sonuçları ile uyum sağlamaktadır. Söz konusu izolatlardan genotipik çalışma sonucu 2 adet *vanC1* ve 1 adet *vanC2* geni tespit edilmesi de 2009 yılında İspanya’da yapılan çalışma (109) ile uyum sağladığı değerlendirilmektedir.

ABD’de 1998-2003 yılları arasında 18 besi sığırı ve 18 inek çiftliğinde dışkı örneklerinden yapılan çalışmada *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatlarının hiçbirinde vankomisine direnç belirlenmemiştir (115).

Tablo 5.2. Dünyada ve ülkemizde sığır ve köpeklerde yapılan VRE çalışmaları

ÜLKE (YIL)	Tür %	Fenotip	Genotip	Özellikler	Kaynak (No)
Hollanda (1996)	<i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i> % 48	VanA VanC	<i>vanA</i> <i>vanC1</i>	23 köpek dışkı örneği	(113)
İspanya (1998-2003)	<i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i> % 17	VanA VanC	<i>vanA</i> <i>vanC1</i>	87 köpek dışkı örneği	(111)
İspanya (2009)	<i>E. gallinarum</i> % 12	VanC	<i>vanC1</i>	126 köpek dışkı örneği	(109)
Türkiye (2001)	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> % 14	VanA VanB		Köpek dışkı örneği	(106)
Macaristan (2001-2004)	<i>E. faecalis</i>		2001 yılı =% 6 2002 yılı =% 1,7 2003 yılı =% 14,9	Sığır dışkı örneği	(116)
Kore (2003)	<i>E. casseliflavus</i> % 2,7	VanC	<i>vanC2</i>	37 sığır dışkı örneği	(117)
ABD (2003)	<i>E. casseliflavus</i> % 3,6	VanC	<i>vanC2</i>	12 sığır dışkı örneği	(118)

ABD’de 2003 yılında çeşitli hayvan türlerinde yapılan VRE tarama çalışmasında 12 sığır dışkı örneğinden toplam 111 VRE izolatu elde edilmiştir. Söz konusu izolatlardan seçilen 4 adetinin yapılan genotiplendirme çalışması sonucunda *vanC2* geni taşıyan *E. casseliflavus* olduğu belirlenmiştir (118).

Sığır dışkı örneklerinde ABD’de 2008 yılında ve ülkemizde Mete tarafından 2003 yılında Denizli’de yapılan çalışmada VRE tespit edilememiştir (119,120).

Bu çalışmada sığır dışkı örneklerinden 8 adet *E. faecium* izolatının tespit edilmesi yurtdışında ve ülkemizde yapılan çalışmalarda elde edilen türler ile uyum sağlamaktadır (Tablo 5.2). Farklı olarak bu çalışmada ve 1 adet *vanC1* geni taşıyan *E. gallinarum* suşu tanımlanmış olup bu sonucun sığır besihaneleri ile kanatlı çiftlikleri arasındaki çapraz kontaminasyon sonucu olabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışmada beş adet *E. faecium* izolatu disk difüzyon ve E-test yöntemiyle vankomisine ve teikoplanine dirençli bulunmuştur. Fakat PCR ile *vanA* ve *vanB* geni saptanamayan söz konusu izolatlarda glikopeptit direnç geninin olmadığını söylemek doğru değildir. Bu genlerin gösterildiği çalışmalarda PCR için kullanılan primer

dizilimler de çok önemlidir. Aynı ya da farklı primer dizilimi kullanan çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur (100,102,104,117,118,121-124). Ayrıca *E.faecium* suşlarında glikopeptit direncine *vanD* geninin de neden olabileceği düşünülmektedir (70).

Yukarıda açıklanan çalışmalar, çeşitli hayvan türlerinin enterokok florasının coğrafik bölgelere, yaşlara ve izolasyon metotlarının farklılıklarına göre sıklıklarının değişebilmesine karşın belirli türleri içerdiğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen enterokok türlerinin dağılımı insanlarda hastalıklara neden olan türlere benzerlikleri bakımından önem taşımaktadır. İnsanlarda hastalık oluşturan enterokok türlerinin %85-89'nu *E.faecalis*, % 10-15'ni *E.faecium*, % 5'ten az oranda *E.gallinarum*, *E. durans*, *E.casseliflavus*, *E.avium* ve *E.raffiniosus* olduğu bildirilmiştir (125). Hayvanlarda antibiyotiklerin yaygın kullanımı hayvanların intestinal floralarına dirençli suşların yerleşmesine neden olmaktadır. Hayvansal kökenli çoğul dirençli flora bakterileri insanlara direkt yolla veya hayvansal gıdalar aracılığı ile bulaşabilmektedir. Bu antibiyotik dirençli suşların insanlara bulaşması sonucu meydana gelebilecek infeksiyonların tedavilerinin güçleşmesine neden olmaktadır. Özellikle vankomisin dirençli enterokoklar halk sağlığında önemli bir global sorun haline gelmiştir (126,127).

Yurtdışında ve ülkemizde yapılan çalışmalarda (Tablo 5.3) kanatlılardan izole edilen enterokokların ortak olarak tetrasikline, eritromisine, qoinupristin/dalfopristine, siprofloksasine, streptomisine ve gentamisine direnç gösterdikleri gözlenmektedir. Bu çalışmada elde edilen izolatlar da diğer çalışmalarla uyumlu olarak sözkonusu antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuştur. Farklı olarak tetrasikline, eritromisine, siprofloksasine, streptomisine ve gentamisine direnç oranlarının ülkemizdeki ve yurtdışı çalışmalardaki direnç oranlarına göre düşük olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada broyler ve yumurtacı tavuklardan elde edilen enterokok izolatlarının % 95 oranında qoinupristin/dalfopristine dirençli olması ABD'de Hersberger et al (115) ve İngiltere'de Migura et al (128) yaptığı çalışmadaki bulgular ile uyum sağlamaktadır. Fakat bu çalışmadaki qoinupristin/dalfopristin direnci ülkemizde Dilik (107) tarafından bulunan direnç (%33,6) oranından yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin virjinamisinin yem katkı maddesi olarak kullanım oranları farklılığının etkisi olduğu düşünülmektedir. Yurtiçi ve yurtdışı çalışmalarında kanatlılardan izole edilen enterokokların antibiyotik

duyarlılık test sonuçlarının değişkenlik göstermesi kullanılan antibiyotiklerin, kullanım dozlarının ve prosedürlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 5.3. Dünyada ve ülkemizde kanatlılardan elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarında antibiyotik direnç oranları

ÜLKE (YIL)	P (%)	TE (%)	E (%)	CN (%)	SYN (%)	S (%)	CIP (%)	C (%)	Kaynak (No)
Hollanda (1997)		98	98	40	12				(99)
Çek Cumhuriyeti (1999-2000)		80	59			22			(101)
ABD (1998-2003)				12	85		23		(115)
İngiltere (2002-2003)					50				(128)
Macaristan (2001-2004)		74,7	40,7			1,1			(116)
Kore (2003)	85	100	85				100	71	(117)
Portekiz (2004)		94	87		33		18,5	7	(104)
Almanya (2004-2005)			13,8		13,8		17,2		(129)
Litvanya (2008-2009)		75,6	56,8		39,4		41,9		(105)
Türkiye (2001)		30,7	7,6	34,6		73			(106)
Türkiye (2005)	5,6	72	59,3	23,1	33,6				(107)
Türkiye (2007)	1,2	55	45	17,5		65	9	9	(97)

CIP : Siprofloksasin

S : Streptomisin

SYN : Quinupristin/Dalfopristin

C : Kloramfenikol

TE : Tetrasiklin

E : Eritromisin

CN : Gentamisin

P : Penisilin

Bu çalışmada köpeklerden elde edilen 11 enterokok izolatının % 81'nin quinupristin/dalfopristine, % 63'nün vankomisine, % 36'nın teikoplanine, % 18'nin streptomisine dirençli olduğu belirlenmiş olup yurt içi ve yurt dışındaki çalışmalarda (Tablo 5.4) ortak olarak direnç tespit edilen tetrasiklin, eritromisin ve siprofloksasine direnç gözlenmemiştir. Bunun nedeninin örneklerin alındığı köpeklerin daha önce tedavi geçmişlerinin olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tablo 5.4. Dünyada ve ülkemizde köpeklerden elde edilen *Enterococcus* spp. izolatlarında antibiyotik direnç oranları

ÜLKE (YIL)	TE (%)	E (%)	CIP (%)	CN (%)	SYN (%)	S (%)	C (%)	Kaynak (No)
İspanya (1998-2003)	100	91	40		6		33	(111)
Portekiz (2003)	52	39	18		15	10	6	(104)
İtalya (2005)	84,6	84,6	57,7					(110)
Danimarka (2006)	30	30	20		20			(112)
İspanya (2009)	100	33	47			13		(109)
Türkiye (2006)	70,3	69,2		15,4			12,1	(114)

CIP : Siprofloksasin

S : Streptomisin

SYN : Qoinupristin/Dalfopristin

C : Kloramfenikol

TE : Tetrasiklin

E : Eritromisin

CN : Gentamisin

Sığır dışkısı kökenli örneklerden yapılan çalışmalarda; Hersberger et al (115) tarafından ABD’de besi sığırlarından izole edilen *E.faecium* izolatlarının siprofloksasine, gentamisine, qoinupristin/dalfopristine olan direnç oranlarının sırasıyla % 55, % 0, % 2 olduğu, ineklerdeki oranların ise sırasıyla % 47, % 7, % 8 olduğu bildirilmiştir. Kaszanyitzky et al (116) ise Macaristan’da sığır kökenli *Enterococcus* spp. izolatlarının 2001 yılından 2004 yılına kadar tetrasikline ve eritromisine olan dirençliliklerinin sırasıyla % 11,3 ve % 29,5 oranında artış göstererek % 29,8 ve % 44,7 olduğunu tespit etmişlerdir. Jung et al (117) yaptıkları çalışmada sığır dışkı örneklerinden izole edilen *vanC2* taşıyan *E.casseliflavus* izolatının siprofloksasine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde Mete (120) tarafından Denizli’de yapılan çalışmada 65 adet sığır kökenli enterokok izolatında siprofloksasin direncinin % 15,3 olduğunu, izolatlarda vankomisin, teikoplanin, tetrasiklin ve penisilin direnci saptanamadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmadaki sığır kökenli 9 enterokok izolatında qoinupristin/dalfopristin, siprofloksasin, tetrasiklin ve eritromisin direnç varlığı tespit edilmesi yurtiçi ve yurtdışında yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir.

Ülkemizde çiftlik hayvanlarında patojen ve kommensal bakterilerdeki antibiyotiklere karşı direncin oluşması ve bakterilerdeki çoğul dirençliliğin engellenmesinde ideal olan kontrol önlemlerinin alınmasından çok bilinçsiz ilaç kullanımının sona erdirilmesidir. Bu konuda çiftçiler ve veteriner hekimlerin bilinçli davranmasının yanında ulusal antimikrobiyal kullanım stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Kayseri bölgesinde çeşitli hayvan türlerinin gastrointestinal sistemlerinden izole edilen enterokokların:

1. Vankomisine ve teikoplanine direnç oranlarının düşük seviyede olmasının Türkiye’de avoparsin kullanımının yasaklanmasından sonra tamamen yok olmayıp düşük seviyede de olsa devam ettiğini düşündürmektedir.
2. Qoinupristin/dalfopristin direncinin yüksek olmasının Türkiye’deki hastane kaynaklı enfeksiyonlarda hala bir sorun olan VRE’nin tedavi seçeneği olarak dikkatli kullanılması gerektiği,
3. Çoklu antibiyotik dirençliliğin gözlenmesinin halk sağlığı açısından büyük sorun olabileceği değerlendirilmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Facklam RR, Teixeria LM. *Enterococcus*. In: Collier L, Bolows A, Sussman M (eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Vol 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edward Arnold, 9th edition. London 1998: p 669-682.
2. Bilström H. Molecular epidemiology of clinical *E.faecium*. Carolinska Institutet. Thesis 2008.
3. Charles MAP, Franz AB, Silberhorn M, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel HW. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 4385-4389.
4. Moellering RC, JR. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. Principles and Practice of Infectious Diseases In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). 5th ed. New York. Churchill Livingstone. 2005: p 2411-2421.
5. Gültekin M, Günseren F. Vankomisin dirençli enterokoklar. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2000; 4: 195-204.
6. Durmaz G. Enterokoklar. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Kitabında: Willke A, Söyletir G, Doğanay M (editörler) Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 2008: 2: p 2057-2065.
7. Thankson JD, Thaxton JP, Vizzier Y. Biochemical and immunological changes in chickens experiencing pulmonary hypertension syndrome caused by *Enterococcus faecalis*. Poult Sci 2002; 81: 1826- 1831.

8. Jackson CR, Cray P, Baret J, Ladely S. Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis* 2004; 48: 100-107.
9. Elsinghorst TH. AM. First Cases of Animal diseases published since 2000. 2.Cats. *Vet. Quarterly* 2003; 4: 124- 130.
10. Hirsh DC, Biberstein EL. *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Veterinary Microbiology* In: Hirsh DC, Maclachlan NJ, Walker RL (eds). 2 nd ed. Ames, Blackwell Publishing, 2004: p 159–167.
11. Leclerg R, Courvalin P. Emerging problems with enterococcal infections. *Cur Opin Infect Dis* 1996; 9: 115- 119.
12. Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prevent Vet Med* 1997; 31: 95- 112.
13. Rodrigues J, Poeta P, Martin SA, Costa MD. The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains with special reference to vancomycin. *J Vet Med* 2002; 49: 278- 280.
14. Rice LB, Shlaes DM. Vancomycin resistance in the *Enterococcus*. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 601-608.
15. Murray BE. Vancomycin resistant enterococci. *Am J Med* 1997; 101: 284-93.
16. French GL. Enterococci and Vancomycin resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 7: 75-83.
17. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1998; 57-58.
18. Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, Gültekin M ve ark. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *Ankem Derg* 1999; 13: 1-4.
19. Akçimen B. Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Vankomisin Dirençli Enterokokların Pulsed Field Gel Elektroforez Yöntemiyle Genotip Tayini, Tıpta Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Adana 2010: 128.
20. Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. *Enterococcus*. *Manual of Clinical Microbiology*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). 9th ed. Washington DC, ASM Press. 2007; 1: p 430-442.

21. List of validly published bacterial names compiled by Leibniz Institute DSMZ (Deutsche Sammlung van Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Braunschweig, Germany. www.dsmz.de/.../DSMZ_bactnames.txt.(10.02.2011).
22. Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williamsa Wilkins. 6th ed. 2006; 640- 643.
23. Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 1567-1574.
24. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009; 155: 1749-1757.
25. Angeletti S, Lorino G, Gherardi G, Battistoni F, Cesaris MD, Dicuonzo G. Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16 S ribosomal DNA sequencing. J Clin Microbiol 2001; 39: 794-797.
26. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 3558-3565.
27. Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci, In Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin R, Dunne GM, Murray BE., and Rice LB (ed.), The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. ASM Press, Washington, D.C. 2002: p 1-54.
28. Carvalho MGS, Steigervalt AG, Morey RE, Shewmaker PL, Teixeira LM, Facklam RR. Characterization of three new enterococcal species *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E1, *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E2, and *Enterococcus* sp. nov. CDC PNS-E3 isolated from human clinical specimens. J Clin Microbiol 2004; 42: 1192-1198.
29. Savor C, Pfaller MA, Kruszynski JA, Hollis RJ, Noskin GA, Peterson LR. Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiologic data. J Clin Microbiol 1998; 36: 3327-3331.

30. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
31. Nallaparaddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 868-876.
32. Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 301- 305.
33. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *CMLS, Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 2622–2636.
34. Shankar N, Baghdayan AS, Willems R, Hammerum AM, Jensen LB. Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pigs in Denmark. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4200-4203.
35. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS.. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002; 417: 746-750.
36. Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 609-618.
37. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 308-320.
38. Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes* 2006;4: 163- 174.
39. Gültekin M. Enterokoklar: Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara 2004: 121-140.
40. Tailor ANS, Bailey E, Rybak MJ. *Enterococcus*, an emerging pathogen. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 1231-1241.

41. Saymer HS. Hastanemizde Surveyansla Saptanan VRE'lerin dağılımı, Antibiyotik Duyarlılıkları Ve Kolonize Hastalarda Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi Tıpta Uzmanlık Tezi T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul 2008: 67.
42. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 232-235.
43. Coque TM, Willems RJL, Fortu'n J, Top J, Diz S, Loza E, Canto'n R, Baquero F. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University Hospital: Setting the scene for a future increase in vancomycin resistance. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 2693-2700.
44. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun 2006; 74: 4164-4171.
45. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. Emerg Infect Dis 1998; 4: 37-47.
46. Devriese LA, Uyttendaele E, Ducatelle R, Viaene N, Derijcke J, Gevaert D. Tracheitis due to *Enterococcus faecalis* in canaries. J Assoc Avian Vet 1990; 4: 113-116.
47. Lapointe JM, Higgins R, Barette N, Milette S. *Enterococcus hirae* enteropathy with ascending cholangitis and pancreatitis in a kitten. Vet Pathol 2000; 37: 282- 284.
48. Rosenthal VD, Maki DG, Janulitrat S, Medeiros EA, Todi SK, Gomez DY, Leblebicioglu H. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. Am J Infect Control 2010; 38: 95-104.
49. Moellering RC. *Enterococcus* Species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* Species. Principles and Practice of Infectious Diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). 6th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone. 2005; 2: p 2411-2417.
50. Durmaz G. Enterokoklar. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Kitabında: Willke A, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 2008: 2: p 2057-2065.

51. Sommers MH, Dowell VR. The gram positive cocci. In:Winn W, Allen S, Janda W, Konemann EW, Procop P (eds). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia, W&W Lippincott company. 2006: p 700-704.
52. Gültekin M. Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Önemli ve Sorunlu Bakteri İnfeksiyonları. Ankara. Bilimsel tıp yayınevi 2004: p 121-140
53. Taşova Y, İnal S. Enterokok infeksiyonlarında klinik. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Vankomisine dirençli enterokoklar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.2004: 17-22.
54. Gültekin M, Günseren F. Vankomisin dirençli enterokoklar. Hastane İnfeksiyonları Derg 2000; 4: 195-204.
55. Linden PK, Pasculle AW, Manez R, et al. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin susceptible *E. faecium*. Clin Infect Dis 1996; 22: 663-670.
56. Başustaoğlu A, Aydoğan H. Enterokoklar. Ed: Uzun Ö. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2002: 5: p 45-60.
57. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, infection, detection, and treatment. Mayo Clin Proc 2006; 81: 529-536.
58. Yıldırım M. Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. Düzce Üni Tıp Fak Derg 2007; 2: 46-52.
59. Zeana C, Kubin JC, Della-Latta P, Hammer SM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis successfully managed with linezolid: case report and review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 33: 477-482.
60. Taşova Y, İnal AS. Enterokok infeksiyonlarında klinik. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004: 17-22.
61. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. Int J Food Microbiol 2003; 88: 269–290.
62. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 686-707.

63. Mete B. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sadi Sun Yoğun Bakım Ünitesinde Saptanan Vankomisine Dirençli Enterokok Salgınının Mikrobiyolojik., Epidemiyolojik ve Klinik Yönleriyle İrdelenmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı , İstanbul 2003: 73.
64. Marothi YA, Agrihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance –An overview. Indian J Med Microbiol 2005; 23: 214-219.
65. Erçal BD. Vankomisine Dirençli Enterokokların Moleküler Epidemiyolojisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2011: 81.
66. Murray BE. The life and times of the enterococcus. Clin Microbiol Rev 1990; 3 : 46-65.
67. Bersos Z, Maniati M, Kontos F, Petikani E, Maniatis AN. First report of a linezolid resistant vancomycin resistant *Enterococcus faecium* strain in Greece. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 685- 686.
68. Korten V. Linezolid. Ankem Derg 2004; 18: 178- 180.
69. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the *Pneumococcus*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 4: 3554- 3557.
70. Sümerkan B. Vankomisine Dirençli Enterokoklar. In: Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Leblebicioğlu H, eds. Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları Samsun: Samsun İnfeksiyonları Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Araştırmaları Derneği 2002: 329-334.
71. Gómez-Gila R, Romero-Gómez MP, García-Ariasa A, Ubedab MG, Busseloc MS, Cisternac R, Gutiérrez-Altés A, Mingorancea J. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65: 175–179.
72. French GL. Enterococci and vancomycin resistance. Clin Infect Dis 1998; 27: 75–83.
73. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 21–25.

74. Çetinkaya Y. Enterokolarda direnç sorunu. Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004: p 10-16.
75. Clewell DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9: 90-102.
76. Bugg TDH, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine-D-alanine ligase of altered substrate specificity. Biochemistry 1991; 30: 2017–2021.
77. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. J Bacteriol 1993; 175: 117-127.
78. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1563–1571.
79. Reynolds PE, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, Cuorvalin P. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. Mol Microbiol. 1994; 13: 1065- 1070.
80. Mendez-Alvarez S, Perez- Hernandez X, Claverie-Martin F. Glycopeptide resistance in enterococci. Int Microbiol 2000; 3: 71- 80.
81. Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004: p 141-158.
82. English BK, Shenep JL: Enterococcal and Viridans Streptococcal infections. In:Feigin RD, Cherry JD (eds). Textbook of Pediatric Infectious Dis. 5th edition. Philedelphia: WB Saunders Company, 2004; 1175–1192.
83. Çelik Ü, Alhan E. Pediatrik Enfeksiyonlarda Zorlu Patojen: Enterokoklar Derleme. Çocuk Enfeksiyon Dergisi 2008; 2: 58–66.
84. Frossley K. Vancomycin-resistant enterococci in long-term care facilities. Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19: 521–525.
85. Korten V: Enterokoklar. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (ed'ler) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, 2002: p 1497–1506.
86. Şehnaz A, Şardan YÇ. Vankomisine Dirençli Enterokokların Epidemiyolojisi ve Kontrolü. Hacettepe Tıp Dergisi 2008; 39: 89–95.

87. Koç F. İshalli Çocukların Dışkılarından İzole Edilen Enterokoklarda Vankomisin Direnci Ve Yüksek Düzeyde Aminoglikozit Direncinin Araştırılması Tıpta Uzmanlık Tezi, T.C. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Kırıkkale 2009: 69.
88. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27: 731-734.
89. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. “The Gram Positive Cocci, Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria”. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Philadelphia. Lippincott, 1997: p 577- 629.
90. Gordon LP, Damm MAS, Anderson JD. Rapid Presumptive Identification of Streptococci Directly from Blood Cultures by Serologic Tests and the L-Pyrrolidonyl-3- Naphthylamide Reaction. J Clin Microbiol 1987; 25: 238- 241.
91. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, CLSI Document M100- S20, Wayne, PA, 2010.
92. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 24-27
93. Kariyama R, Mitsuhata RW, Chow JB, Clewell D, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38: 3092-3095.
94. Facklam RR, Sahm DF, Teixeira LM. *Enterococcus*: Murray PR, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Yolken YH. Manual of clinical microbiology. Washington: ASM. 1999: p 297-305.
95. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal Infections: Host response, therapeutic and prophylactic possibilities. Vaccine 2004; 22: 822- 830.
96. Berzeg D. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ve E test ile Vankomisin Mik Değerlerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul 2005: 96.

97. Kaya S, Çetin SE, Arıkan S, Tetik T, Kesbiç H, et al. Tavuklardan İzole Edilen *E.coli*, *Klebsiella* ve Enterokoklarda Antibiyotik Duyarlılık Durumları. S D Ü Tıp Fak Derg 2007; 14: 24-27.
98. Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. Microb Drug Resist. 1995; 1: 255-7.
99. Van den Bogaard AE, Willems R, London N, Top J, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 497-505.
100. Seo SK, Lim JY, Yoo HS, Bae WK, Park YH. Comparison of vancomycin-resistant enterococci isolates from human, poultry and pigs in Korea. Vet Microbiol 2005; 106: 225-23.
101. Kolar M, Pantucek R, Bardon J, Vagnerova I, Typovsk H, Valka I, Doskar J. Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. Vet Med Czech 2002; 47: 52-59.
102. Chan YY, Nasir MHBA, Yahaya MAB, Salleh NMAB. et al. Low prevalence of vancomycin- and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. Int J Food Microbiol 2008; 122: 221-226.
103. Nilsson O, Greko C, Bengtsson B. Environmental contamination by vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish broiler production. Acta Vet Scand 2009; 51: 1-6.
104. Poeta P, Costa D, Rodriguez J, Torres C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 131-137.
105. Ruzauskas M, Siugzdiniene R, Spakauskas V, Povilonis J, Seputiene V, et al. Susceptibility of bacteria of the *Enterococcus* genus isolated on Lithuanian poultry farms, Veterinari Medicina 2009; 54: 583-588.
106. Çelik S. Hayvan Kökenli Enterokok Suşlarının Virülens Faktörleri, Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2001: 70.
107. Dilik Z. Entansif Broyler İşletmeleri ile Kırsal İşletmelerinden İzole Edilen Enterokokların Fenotipik ve Genotipik Özellikleri Üzerinde Çalışmalar, Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale 2008: 74.

108. Ünal N, Dilik Z, Yıldırım M. Türkiye’de ticari broyler işletmelerinden *vanA* pozitif *Enterococcus faecium* izolasyonu. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16: 127-129.
109. Lopez M, Tenorio C, Torres C. Study of vancomycin resistance in faecal enterococci from healthy humans and dogs in Spain a decade after the avoparcin ban in Europe. Zoonoses and Public Health. Online yayım tarihi: 31 Mayıs 2012.
110. Ossiprandi MC, Bottarelli E, Cattabiani F, Bianchi E. Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 *Enterococcus* strains isolated from dogs in Italy. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2008; 31: 1-9.
111. Herrero A, Fernandez-Garayzabal JF, Moreno MA, Dominguez L. Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol 2004; 42: 1384-1385
112. Damborg P, Sorensen AH, Guardabassi L. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs. First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. Vet Microbiol 2008; 132: 190-196.
113. Belkum AV, Braak N van den, Thomassen R, Verbrugh H, Endtz H. Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs. Lancet 1996; 348.
114. Türkyılmaz S, Erdem V, Bozdoğan B. Investigation of antimicrobial susceptibility for enterococci isolated from cats and dogs and the determination of resistance genes by polymerase chain reaction. Turk J Vet Anim Sci 2010; 34: 61-68.
115. Hershberger E, Oprea SF, Donabedian SM, Mary P, Bozigar P et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 127-130.
116. Kaszanyitzky EJ, Tenk M, Ghidan A, Fehervari GY, Papp M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. Int J Food Microbiol 2007; 115: 119-123.
117. Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK et al. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. Int J Food Microbiol 2007; 113: 102-107.
118. Rice EW, Boczek LA, Johnson CH, Messer JW. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46: 155-158.

119. Donabedian SM, Perri MB, Abdujamilova N, Gordoncillo MJ, Naqvi A, Reyes KC et al. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan countries. J Clin Microbiol 2010; 48: 4156-4160.
120. Mete E. Besicilerde vankomisine dirençli enterokok araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli 2003: 62.
121. Butaye P, Devriese L. A, Goossens H, Ieven M, Haesebrouck F. Enterococci with acquired vancomycin resistance in pigs and chickens of different age groups. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43: 365-366.
122. Khan SA, Nawaz MS, Khan AA, Hopper SL, Jones RA, Cerniglia C.E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. Mol Cell Probes 2005; 19: 27-34.
123. Kühn I, Iversen A, Finn M, Greko C, Burman LG, Blanch AR, Vilanova X, et al. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans and the environment in different European regions, Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 5383-5390.
124. Xavier DB, Bernal FEM, Almeida RT. Absence of VanA- and VanB-containing enterococci in poultry raised on nonintensive production farms in Brazil. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 3072-3073.
125. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. The Gram Positive Cocci, Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Philadelphia. Lippincott, 1997: p 557-629.
126. Van Den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 327- 355.
127. Lukasova J, Sustackova A. Enterococci and antibiotic resistance. Acta Vet Brno 2003; 72: 315- 323.
128. Migura LG, Pleydell E, Barnes S, Davies RH, Liebana E. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolates from broiler, poultry and pig farms in England and Wales. J Clin Microbiol 2005;43: 3283- 3289.

129. Scwaiger K, Schmied EMV, Bauer J. comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of *Listeria* spp. and *Enterococcus* spp. isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany, Zoonoses Public Health 2010; 57: 171-180.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı :Devrim SARIGÜZEL
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri :03 Mart 1973, MERSİN
Medeni Durumu : Evli
Email :devrimsar73@yahoo.com
Tel : 0352 2359885
Yazışma Adresi : Köşk mah. İNÖNÜ lojmanları F blok D:6
Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece Kurum Mezuniyet Tarihi

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin
Hijyeni ve Teknolojisi-2005
Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi -1996
Lise : Mersin Dumlupınar Lisesi 1990

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl Kurum Görev

Halen 1nci Komando Tugayı B Tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı görevini yürütmektedir.

YABANCI DİL

İngilizce