



**T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2015-0002**

**KEDİLERDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS
FAECALIS* SUŞLARINDA *ESP* GENİ VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Andaç UZER GÜLEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN-2015

T.C
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2015-0002

**KEDİLERDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS*
FAECALIS SUŞLARINDA *ESP* GENİ VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Andaç UZER GÜLEN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şükrü KIRKAN**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Andaç UZER GÜLEN tarafından hazırlanan “KEDİLERDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SUŞLARINDA *ESP* GENİ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez, 31/08/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1- Prof. Dr. Osman KAYA

ADÜ, Veteriner Fakültesi

2- Prof. Dr. Şükrü KIRKAN

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3- Prof. Dr. Cavit KUM

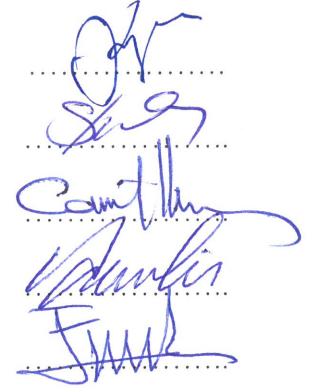
ADÜ, Veteriner Fakültesi

4- Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ

OMÜ, Veteriner Fakültesi

5- Doç. Dr. Ertan Emek ONUK

OMÜ, Veteriner Fakültesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 09100- AYDIN
Santral : (256) 218 20 00 Direkt Telefon : 218 20 44 Fax : (256) 218 20 44

ÖNSÖZ

Enterokoklar beşeri hekimlikte iyi bilinen patojenlerdir. Bu bakterilerin oluşturduğu infeksiyonlar çoğunlukla nozokomiyaldir ve en sık rastlanan tür *Enterococcus faecalis*'tir. Bu organizmalar en sık üriner sistem, kan, endokardiyum, abdomen, safra yolları, yanık yaraları ve hastada kalıcı olan cihazlar (intravasküler kateter gibi) yoluyla infeksiyon oluşturmaktadır.

Sıkça karşılaşılan antimikrobiyel dirençli enterokoklar besi hayvanlarında ve hayvansal orijinli gıdalarda gözlenmiştir ve besi hayvanlarının dirençli enterokoklar için bir rezervuar olabileceği, direnç genlerini de gıda zinciri yoluyla insanlara aktarma yeteneğinde olduğu öne sürülmektedir.

Enterokoklar, insanlar da dahil olmak üzere neredeyse tüm hayvan türlerinin bağırsaklarında incelenmiştir. Türler, konakçı hayvandan konakçı hayvana ve hayvanların yaşlarına göre farklılık gösterir. Enterokok türlerinin tanısı biyokimyasal ve fizyolojik testlerle konulmaktadır. Genetik ve moleküler yöntemlerle identifikasyonunda ise DNA hibridizasyon, ribotipleme, pulsed field jel elektroforezi (PGFE), PCR gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Bakteriyemili hastalardan elde edilen *E. faecalis* izolatlarında *esp* geninin varlığı ve antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Enterokoklarda yüksek düzeyde gentamisin direnci (HLGR) genellikle bifonksiyonel Aac(6')-Aph(2'') aminoglikozid-modifiye eden enzim varlığı nedeniyle gerçekleşmektedir. HLGR enterokoklar, endokardit gibi çeşitli enterokokal enfeksiyonlar için antibiyotik tedavisi ile ilgili endişeye neden olmuştur, çünkü vankomisin veya ampicilin gibi hücre duvarı aktif antibiyotikler ile sinerji artık beklenmemektedir. Aynı türe ait hayvanlarda antibiyotik dirençli enterokokların dağılımı da, bu türlerin hayvanlardan insanlara bulaşması veya hastanelerde hayvanlar arasında kontaminasyon oluşması endişesi ile incelenmiştir. Ancak hayvan kökenli enterokoklarda yüksek derecede gentamisin direncinin, *esp* geninin varlığı ile anlamlı bir ilişkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle aynı türe ait hayvanlardan elde edilen *Enterococcus* izolatlarında *esp* geninin varlığı ve gentamisin direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamız, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından VTF-14010 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER	vi
ŞEKİLLER	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Taksonomi	2
1.2. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri	3
1.3. Enterokok İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji	7
1.4. Patogenez	8
1.4.1. Konakçı Dokularda Kolonizasyon-Tutunma-İnvazyon	8
1.4.2. Konakçı İmmunitésinin Modülasyonu	9
1.4.3. Konakçıdaki Patolojik Değişimler	10
1.5. Virulens Faktörleri	11
1.5.1. Sitolizin	11
1.5.2. Agregasyon Faktörü (AF)	13
1.5.3. Ekstraselüler Süperoksit	14
1.5.4. Enterokokal Yüzey Proteini	15
1.5.5. Jelatinaz	16
1.5.6. Lipoteikoik Asit (LTA)	17
1.5.7. Kollajen Bağlayıcı Adezin MSCRAMM Ace	19
1.5.8. Kapsül, Hücre Duvarı Polisakkaritleri	19
1.5.9. Seks Feromonları	20
1.5.10. Hyaluronidaz	21
1.5.11. AS-48	21
1.5.12. Antibiyotik Direnci	22
1.5.12.1. β -Laktam direnci	22
1.5.12.2. Aminoglikozid direnci	23
1.5.13. Kazanılmış direnç	23
1.5.13.1. Glikopeptit direnci	23
1.6. Enterokok İnfeksiyonlarında Tanı	24
1.7. Enterokok İnfeksiyonlarının Tedavisi	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Örnek Toplanması	28

2.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları	28
2.2.1. Besiyerleri	28
2.2.1.1. Brain Heart Infusion Agar	28
2.2.1.2. Brain Heart Infusion Broth	29
2.2.1.3. Enterocococel Agar	29
2.2.1.4. Müller Hinton Agar	30
2.2.2. Enterokokların İzolasyon ve İdentifikasyonu	30
2.2.2.1. Katalaz Testi	31
2.2.2.2. Oksidaz Testi	31
2.2.2.3. Safra Eskülin Testi	31
2.2.2.4. Pyrolidonyl Arylamidase (PYR) testi	31
2.2.2.5. % 6.5 NaCl'de Üreme Testi	32
2.3. PCR Gereçleri	32
2.3.1. Solusyonlar	32
2.3.1.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer	32
2.3.1.2. Gel Loading Buffer (6X)	32
2.3.1.3. Tris (1M)	32
2.3.1.4. NaCl (1M)	33
2.3.1.5. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)	33
2.3.1.6. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set	33
2.3.2. Primerler	33
2.3.3. Termal Döngüleme Cihazı	34
2.3.4. Elektroforez Cihazı	34
2.3.5. Agaroz Jel	34
2.3.6. Marker	35
2.3.7. Etidium Bromür	35
2.3.8. Pozitif Kontrol	35
2.3.9. DNA Ekstraksiyon Kiti	35
2.4. PCR Yöntemi	36
2.4.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi	40
2.4.2. Jelde Yürütme	40
2.4.3. Görüntüleme ve Değerlendirme	40
3. BULGULAR	42

3.1. İzolasyon Bulguları	42
3.2. PCR Bulguları	42
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ	48
ÖZET	49
SUMMARY	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	59
TEŞEKKÜR	60

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	En önemli enterokok türleri ve yaşam ortamları	6
Çizelge 1.2.	Enterokoklarda glikopeptit direnç tipleri	24
Çizelge 2.1.	PCR amplifikasyonlarında kullanılan <i>ddl_{E. faecalis}</i> ve <i>ddl_{E. faecium}</i> primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları	33
Çizelge 2.2.	PCR amplifikasyonlarında kullanılan <i>aph(2'')</i> -Ia1, <i>aph(2'')</i> -Ib1, <i>aph(2'')</i> -Ic1 ve <i>aph(2'')</i> -Id1 primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları	34
Çizelge 2.3.	PCR amplifikasyonlarında kullanılan <i>esp11</i> ve <i>esp12</i> primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları	34
Çizelge.2.4.	<i>ddl_{E. faecalis}</i> ve <i>ddl_{E. faecium}</i> primer çiftleri ile yapılan PCR için mastermiks hazırlanma oranları	36
Çizelge.2.5.	<i>aph(2'')</i> -Ia1, <i>aph(2'')</i> -Ib1, <i>aph(2'')</i> -Ic1 ve <i>aph(2'')</i> -Id1 primer çiftleri ile yapılan PCR için mastermiks hazırlanma oranları	37
Çizelge.2.6.	<i>esp11</i> ve <i>esp12</i> primer primer çiftleri ile yapılan PCR için mastermiks hazırlanma oranları	38
Çizelge.2.7.	<i>ddl_{E. faecalis}</i> ve <i>ddl_{E. faecium}</i> primer çiftleri ile yapılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	39
Çizelge.2.8.	<i>aph(2'')</i> -Ia1, <i>aph(2'')</i> -Ib1, <i>aph(2'')</i> -Ic1 ve <i>aph(2'')</i> -Id1 primer çiftleri ile yapılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	39
Çizelge.2.9.	<i>esp11</i> ve <i>esp12</i> primer çiftleri ile yapılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	40
Çizelge 3.1.	Enterokokların tür bazında identifikasyon oranları	42

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Enterokokların Gram boyama görüntüleri	3
Şekil 1.2.	Enterokokların Streptokok, Laktokok gibi diğer Gram pozitif ve katalaz negatif koklardan ayrımı	5
Şekil 1.3.	Enterokok türleri identifikasyon şeması	6
Şekil 1.4.	<i>E. faecalis</i> (Esp) ve <i>E. faecium</i> (Esp _(fm))'un Esp yüzey proteini ile <i>S. aureus</i> 'un Bap biyofilm ilişkili proteini arasındaki benzerliklerin şematik görünümü.	15
Şekil 1.5.	Patojenitede rol oynayan farklı virulans faktörlerinin şematik gösterimi	18
Şekil 1.6.	Seks-feromon sistemi transfer mekanizması	20
Şekil 1.7.	Cinsiyet feromonu ile indüklenen kümelenme fenomeninin gösterimi.	21
Şekil 2.1.	<i>Enterococcus</i> spp'nin tanımlanması	30
Şekil 2.2.	PYR hidroliz testi	31
Şekil 3.1.	<i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarına ait elektroforez görüntüsü	43
Şekil 3.2.	Aminoglikozid direnç genlerine ait elektroforez görüntüsü	43

1. GİRİŞ

Enterokoklar beşeri hekimlikte iyi bilinen patojenlerdir. Bu bakterilerin oluşturduğu infeksiyonlar çoğunlukla nozokomiyaldir ve en sık rastlanan tür *E. faecalis*'tir (Murray 1990). *E. faecalis* infeksiyonların %80-90'ını oluştururken, *E. faecium* %10-15 ile onu takip eder. Enterokoklar, Avrupa ve ülkemizde çeşitli geleneksel fermente gıdaların üretiminde önemli rollerde olduğu gibi probiyotik olarak da kullanılmaktadır (İşleroglu ve ark 2008).

Bu organizmalar en sık üriner sistem, kan, endokardiyum, abdomen, safra yolları, yanık yaraları ve hastada kalıcı olan cihazlar (intravasküler kateter gibi) yoluyla infeksiyon oluşturur (Jett ve ark 1994). Hemen hemen her kullanışlı antibiyotiğe karşı çoklu direnç geliştiren bu bakterilerin oluşturduğu infeksiyonlar, son yıllarda dikkat çekmeye başlamıştır (Herman ve ark 1991).

Vankomisin (glikopeptid) dirençli enterokoklar hospitalize edilen hastalarda ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Muhtemelen Veteriner Hekimlikte glikopeptid antibiyotiklerin kullanılmaması nedeniyle, yakın zamana kadar hayvanlarda böyle suşların varlığı bilinmemekteydi ve araştırılmamıştı. Avrupa'da, bu antibiyotik grubunun bir üyesi olan avoparsin, çiftlik hayvanlarında büyümeyi desteklemek için kullanılmaktadır. Almanya ve Danimarka'da yapılan araştırmalarda vankomisin direnç oluşumu, hayvanlarda büyüme arttırıcı antibiyotik olarak avoparsin kullanımına bağlanmıştır (Devriese ve ark 1996).

Sıkça karşılaşılan antimikrobiyel dirençli enterokoklar besi hayvanlarında ve hayvansal orijinli gıdalarda gözlenmiştir ve besi hayvanlarının dirençli enterokoklar için bir rezervuar olabileceği, direnç genlerini de gıda zinciri yoluyla insanlara aktarma yeteneğinde olduğu öne sürülmüştür (Aarestrup ve ark 2000).

Enterokoklar, insanlar da dahil olmak üzere neredeyse tüm hayvan türlerinin bağırsaklarında incelenmiştir. Türler, konakçı hayvandan konakçı hayvana ve hayvanların yaşlarına göre farklılık gösterir (Devriese ve ark 1991). Bir köpekte karaciğer apsesinden (Farrar ve ark 1996) ve bir başka köpekte lumbosakral epidural analjesi sonrasında intervertebral disk infeksiyonundan izole edilmiştir (Remedios ve ark 1996). Ancak,

cerrahi operasyonları takiben bu bakterilerin infeksiyonları veteriner hekimlikte bildirilmemiştir. Bu bakterilerin veteriner hekimlikte sorun olmamasının nedeni büyük olasılıkla, yoğun bakım ünitelerinin eksikliği ve daha az sıklıkta uygulanan invaziv cerrahi tekniklerdir. Öte yandan enterokokların, kümes hayvanları, kanarya ve papağanların infeksiyonlarında rol aldığı bilinmektedir (Devriese ve ark 1994). Bunlar büyük ihtimalle sekonder infeksiyonlardır ve altta yatan viral veya bakteriyel infeksiyonlar tarafından tetiklenmiştir (Butaye ve ark 2000).

Enterokok'lar kedi ve köpeklerde otitis eksternaya ve nadiren de üriner yolu infeksiyonlarına neden olmaktadır. *E. durans*, *E. hirae* ve *E. villorum* türleri köpek, kedi, tay ve buzağılarda ishale yol açmaktadır. *E. hirae*'nin bir kedide enteropatiye, karaciğer safra kanalı ve pankreatik kanalında supuratif yangıya neden olduğu rapor edilmiştir (Moellering 2000).

1.1. Taksonomi

Enterokok türleri, *Streptococcaceae* ailesi içinde yer alan katalaz (-), Gram (+) yuvarlak şekilli bakterilerdir. *Streptococcus* genusundan yapısal bakımdan ayrılması zor olduğu için, 1980'li yıllara kadar Streptokok olarak klasifiye edilmiştir. Sınıflandırma analizlerinin ilerlemesiyle birlikte içinde 12 türün bulunduğu ayrı bir genus altında incelenmeye başlanmıştır (Winn ve ark 2006, Moellering 2000).

Enterokoklar, insan ve hayvanların sindirim sisteminin baskın florasını oluşturmakla birlikte toprak, yüzey suları, bitkiler, sebzeler ve böceklerde de bulunmaktadır. Enterokok türlerinden *E. faecium*, *E. faecalis* ve *E. durans*'ın insan dışkılarından sıklıkla identifiye edilmesinin yanında bu bakterilere çiftlik hayvanlarında daha az sıklıkta rastlandığı belirtilmektedir (Tunail 1999, Franz ve ark 1999, Franz ve ark 2003).

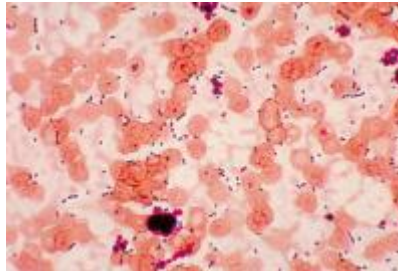
Streptococcus cinsi içinde bulunan ve Lancefield D grubu koklardan oluşan bu genus, 1984 yılı öncesinde fekal streptokok grubunu tanımlamaktadır. *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* türleri ile birlikte *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* ve *Streptococcus faecium* subsp.

casseliflavus alt türlerini de içeren bu grup, 1984 yılında Schleifer ve Kilpper-Balnz tarafından *Enterococcus* cinsi olarak ayrılmıştır (Winn ve ark 2006).

Enterococcus cinsi içinde 12'den fazla tür bulunur. Bu türler arasında *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius*, *E. pseudoavium* bulunmakla birlikte, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. seriolicida*, *E. flavecens* gibi yeni türler de *Enterococcus* cinsi içine katılmıştır (Moellering 2000).

1.2. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri

Enterokoklar, karbonhidratları laktik aside parçalayabilme özelliklerinden dolayı fermentatif laktik asit bakterileri içinde bulunan, Gram pozitif, sporsuz, bazı suşların yalancı katalaz reaksiyonu göstermesine rağmen genellikle katalaz (-), oksidaz (-), fakültatif anaerobik, *E. gallinarum* ve *Enterococcus casseliflavus* gibi bazı türleri dışında hareketsiz, yuvarlak şekilli bakterilerdir (Franz ve ark 1999, Fisher ve ark 2009).

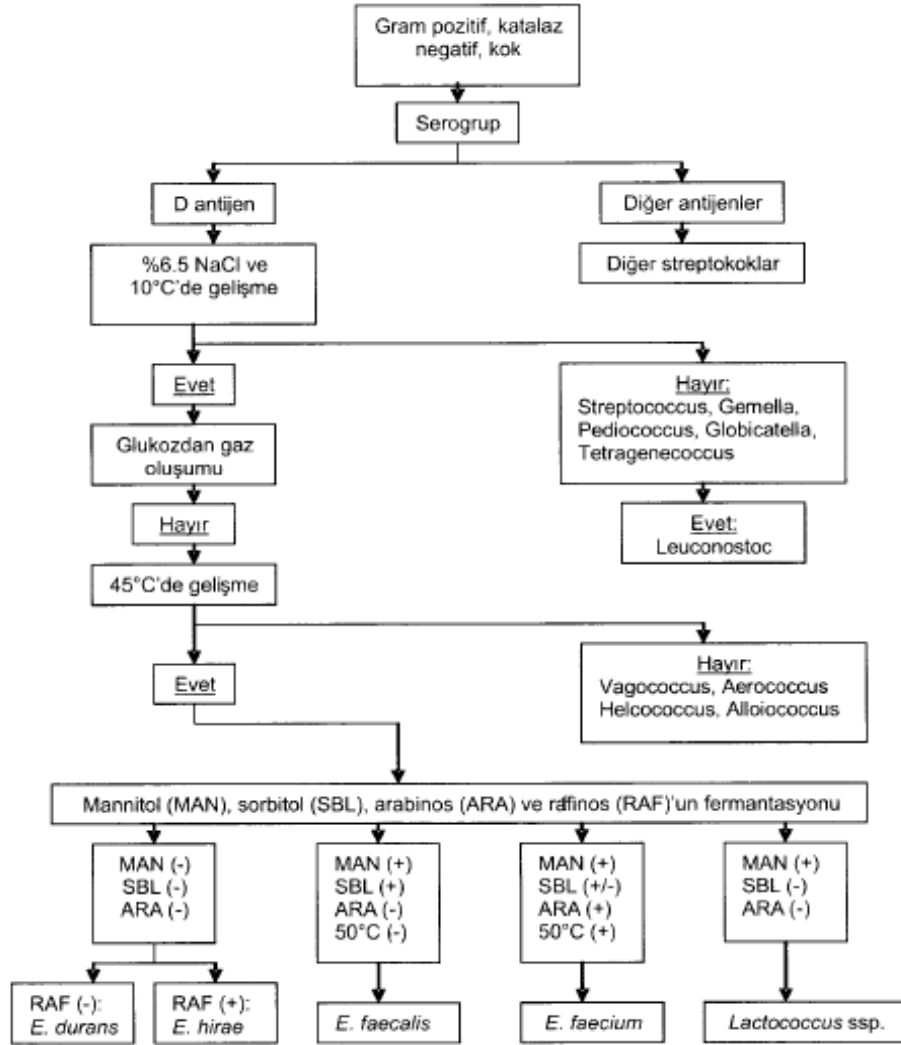


Şekil 1.1. Enterokokların Gram boyama görüntüleri (Akçimen 2010)

Sıvı besiyerinde dipte tortu meydana getirip, besiyerinde turbiditeye neden olmadan ürerler. Enterokoklar dirençli bakterilerdir. 60°C de 30 dk. sıcaklığa karşı dayanıklıdırlar. (Unat 1986). Optimal üreme ısıları 35°C (10-45°C) en iyi üreme pH derecesi 7.2 ±0.2 olmaktadır. % 5 Koyun kanlı agarda 24 saat inkübasyon sonucu, 1 veya 2 mm çapında, Streptokoklardan daha geniş, kabarık, mat renkli S tipi koloniler meydana getirirler. *E. faecalis* suşlarının 1/3'ü insan, tavşan ve at kanlı agarda β-hemoliz meydana getirebilir ancak koyun kanlı agarda hemoliz yapmaz. (Facklam ve Teixeira 1998, Winn ve ark 2006, Fisher ve Phillips 2009). Fakat bazı *E. durans* suşları bütün kanlı agarlarda β-hemoliz meydana getirirler. Genellikle diğer türlerin hepsi α- hemolitik veya nonhemolitikdir. Alfa hemolitik görünen türler gerçekte peroksit üreten nonhemolitik suşlardır. Besiyerindeki

yeşil renk α -toksin ile ilgili değil, eritrositlerde peroksitin etkisi ile meydana gelmektedir. *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. casseliflavus*, *E. gilvus* ve *E. sulfureus* kanlı agarda sarı pigment meydana getirir (Winn ve ark 2006). Enterokoklar bazal metabolik aktiviteleri için, B kompleks vitaminlerine, nükleik asit bazlarına ve karbon kaynaklarına ihtiyaçduymaktadır. *E. faecalis*'in çoğalması için metionin, histidin, izolösin, ve triptofan gerekli iken, diğer bazı türler, glutamat, arginin, glisin, lösin ve valine gereksinim duyarlar. Ancak bazı türlerde bu aminoasitlere ihtiyaç bulunmaz (Facklam ve ark 1998, Korten ve ark 1997).

Enterokok türleri kemoorganotrofikler ve homofermentatif laktik asit fermentasyonu ile heksozlardan L - laktik asit oluştururlar. *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hiraeve*, *E. mundtii* 10-45 °C de, % 6,5 NaCl, % 40 safra tuzu varlığında ve pH 9,6'da gelişebilmeleri ile streptokok, laktokok gibi Gram pozitif ve katalaz negatif homofermentatif koklardan kolaylıkla ayrılabilirler (Şekil 1.2) (Stiles ve ark 1997, Klein 2003, Foulquie Moreno ve ark 2006).



Şekil 1.2. Enterokokların Streptokok, Laktokok gibi diğer Gram pozitif ve katalaz negatif koklardan ayrımı (Klein 2003)

1.3. Enterokok İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji

Enterokoklar insan ve hayvan bağırsak florasının önemli bir üyesidir. Enterokoklar bağırsakta kolonize olan gram pozitif bakteriler arasında en yoğun saptanan bakterilerdir. Bu bölgede en sık *E. faecalis* izole edilir. *E. faecium* diğer enterokok türlerine göre hayvanlarda daha fazla bulunurken *E. mundtii* ve *E. casseliflavus* bitkilerde bulunur. Ayrıca yapılan birçok araştırmada enterokoklar içinde en fazla identifiye edilen türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur (Çetinkaya ve ark 2000). Özellikle Vankomisin'in hastanelerde sık olarak kullanılmaya başlandığı 1989 yılından itibaren, Avrupa ülkeleri ve ABD başta glikopeptid antibiyotikleri olmak üzere beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı dirençli klinik izolat ve vaka ihbarı yapılmış, vankomisin dirençli enterokokların özellikle *E. faecium*'un klonal seleksiyona uğrayarak hastane ortamında sık bulunduğu, tek başlarına veya Stafilokoklarla birlikte hastane infeksiyonlarındaki insidanslarını hızla yükselttikleri tespit edilmiştir (Çetinkaya ve ark 2000).

Ayrıca enterokoklar endodontik tedavi başarısızlıklarında rol oynar ve genellikle kök kanal sisteminden izole edilmektedir. *E. faecalis* insanların endodontik enfeksiyonlarından % 80-90 oranlarında sorumlu bulunmaktadır. Genellikle kök kanallarından tek bir enterokok türü izole edilmektedir (Chou ve ark 2000).

Ülkemizde 1998 yılında Vural ve arkadaşları tarafından vankomisin dirençli *E. faecium* suşu ilk defa izole edilmiştir. Bu suş malign histiositozis tanısı konulmuş, bronkopulmoner infeksiyonu olan bir bebekte pleural sıvıdan izole edilmiştir (Vural ve ark 1999).

Avrupa ülkelerinde çiftlik hayvanları, tavuklar, et ürünleri ve atık su numunelerinde *VanA* tipi VRE önemli bir sorun haline gelmiştir. Rezervuar çeşitliliğinin fazla olması gıdalar aracılığıyla insanlara da bulaşmaya neden olmuş ve toplumda VRE insidansı % 12 oranına kadar çıkmıştır. Ancak 1994 yılından itibaren birçok ülkede Avoparsin kullanımının kaldırılması ve hastalarda glikopeptid grubu antibiyotiklerin sınırlı kullanımı sonucu bu ülkelerden bildirilen VRE oranlarında azalma tespit edildiği saptanmıştır (Wegener 1998).

Bununla birlikte *VanA* transpozon *Tn-1546* ile oluşturulan direnç, hayvanlar arasında VRE'nin klonal oluşumunu hızlandırmıştır. VRE'ler gıda ile insana geçerek

gastrointestinal kolonizasyonu artırmışlardır. ABD’de 1997 yılına kadar insanlarda yüksek düzey dirençli VRE tespit edilmemiştir. Fakat Almanya’da 1994 yılında, sağlıklı insanların % 12’sinde VRE görülmüştür (Aktaş ve Derbentli 2009).

Bu farkın hayvan beslemede glikopeptit grubu antibiyotik kullanılmamasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu sebeplere dayanarak ABD’de VRE kaynaklı hastane infeksiyonlarında en önemli rezervuarın iç florasında kolonizasyon olan hastalar olduğu saptanmış ve VRE ile kolonize hastaların takip amaçlı numune alımı ile izlenmeleri önerilmiştir (Aktaş ve Derbentli 2009).

1.4. Patogenez

1.4.1. Konakçı Dokularda Kolonizasyon-Tutunma-İnvazyon

Klinik çalışmalar nozokomiyal infeksiyonların hastalar arasında enterokok transferi sonucunda meydana geldiğini göstermektedir. Genellikle hastalar nozokomiyal enterokokal infeksiyon gelişimi öncesinde enterokok kolonisini dışarıdan alırlar. Nozokomiyal enterokok infeksiyonları hakkında merak edilen ise bu bakterilerin nasıl kolaylıkla kolonize olabildikleridir. Nozokomiyal enterokokların kolonize olma, fazla büyüme ve konukçu dokuları invaze edebilmeleri konusunda ekstra özellikleri bulunabilmektedir. Bahsedilen bu özellikler; belirgin antienterokokal aktivite olmadan antibiyotik kullanımı ile desteklenmekte, sonuç olarak endojen flora bozulmakta ve nozokomiyal enterokok tarafından kolaylıkla koloni oluşturabilecek bir alan meydana gelmektedir. Bu durum pek çok nozokomiyal enterokok türünün kommensal enterokoklara oranla antibiyotiklere daha fazla dirençli olmalarıyla desteklenmektedir. Amplifiye fragment uzun polimorfizm (AFLP) analizi ile *E. faecium*’un farklı klinik alt gruplarından ve belirli konakçılardan izole edilmesi sonucunda bu ürünlerin AFLP > % 65 benzerlikte gen gruplarına ayrıldığı gösterilmiştir. İlginç olarak hastanede yatan ve yatmayan bireyler arasında belirgin bir dikotomi belirlenmiştir. Belli bir çevre veya konakçıya spesifik bir genetik grup arasındaki ilişki nozokomiyal enterokokların neden hastanede yatan hastalarda daha kolay kolonize oldukları sorusuna cevap oluşturacaktır.

Farede yapılan çalışmalarda gastrointestinal yoldaki kolonizasyonda bağırsak lümeninin epitel hattı boyunca translokasyona uğrayabileceğini göstermektedir. İntestinal veya apikal alanlarda bulunan bakteri adına önerilen mekanizmada epitel hücreler ve

fagositlerin gastrointestinal bakterileri yok edebileceği veya bakterilerin fagositlere doğru göç ederek mezenterik lenf düğümlerinde proliferasyon olarak uzak alanlara sıçrayabileceklerini göstermektedir. Bağırsak epitelyum hattı boyunca *E. faecalis*'in translokasyonuna dair kanıtlar Wells ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Wells çalışmalarında *E. faecalis*'in fare intestinal, karaciğer ve lenf düğümlerinde fazla büyüme gösterdiğini yapmış olduğu örneklemeler ile kültür metotlarıyla göstermiştir. Ayrıca Wells translokasyon yapan bakterilerin sistemik infeksiyonların nedeni olduğunu göstermiştir. Başka bir çalışmada ise yine Wells ve arkadaşları translokasyonun farede kolonda olduğunu göstermişlerdir. In vitro çalışmalarda ise Guzman ve arkadaşları *E. faecalis*'in patogenezi için üriner sistemde ve endokard bölgesinde tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında üriner sistem infeksiyonlarından veya endokarda tutunan bakterilerin ilk olarak üriner sisteme daha sonra ise kalp hücrelerine tutunduğunu ve bunların tutunma özelliklerinin serum ile uyarıldığını göstermişlerdir (Rakita ve ark 2000).

1.4.2. Konakçı İmmunitésinin Modülasyonu

Polimorfonükleer (PMN) lökositler bakteriyel infeksiyonlara karşı insan konakçının kritik bir bileşenidir. İnvaze olan bakteri komplement proteinler veya spesifik antikorlar tarafından kaplanır ve daha sonra PMN'ler tarafından fagosite edilerek öldürülürler. Tamamlayıcı proteinler veya antikorlar tarafından bakterilerin kaplanması süreci fagositozu arttırmaktadır ve bu durum opsonizasyon olarak adlandırılır. Enterokokları öldürme süresince yer alan antikor ve komplementer proteinlerle ilgili yapılan çalışmalar PMN aracılığı yok etmenin hem klasik hem de alternatif yollar tarafından komplement aktivasyonu üzerinden meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır. *E. faecalis* için antikorlar PMN aracılığı yok etmeyi arttırmaktadır ancak bunların yapılan farklı çalışmalarda serum varlığı olmadan gamma globulinler kadar yararlı aktivite göstermediği de belirtilmektedir (Rakita ve ark 2000).

Enterokoklar için bulunan antikorlar insan enterokokkal infeksiyonlarında belirlenmiş olmasına rağmen *E. faecalis*'e karşı yapılan antikorların infeksiyonu önlemedeki rolü karmaşıklaştırmaktadır. Huebner ve arkadaşları antikorların profilaktik ve terapatik etkinliğini faredeki kapsül polisakkarid infeksiyöz modelinde tespit etmişlerdir. Bu duruma ek olarak yüzey agregasyon protein (Agg) için antikorların rolü; endokardiyal vejetasyon oluşumu süresince Agg için spesifik konak antikorunun yokluğunda

endokarditis infeksiyonunda belirlenmiştir. Sonuç olarak bakteriler antikorların etkilerinden kendilerini korumaktadırlar. Ancak başka bir çalışmada tavşan modelinde endokard oluşumundaki Agg için antikor etkinliği herhangi bir koruma göstermemiştir (Portenier ve ark 2003).

İmmün cevabın üstesinden gelebilmek amacıyla *E. faecalis* farklı stratejiler geliştirmektedir. Gentry-Weeks ve arkadaşları fare peritoneal makrofajlarında enterokokların intraselüler hayatta kalmasının 72 saate kadar uzadığını göstermişlerdir. Bu özellik belki de infeksiyon patojenezine katkıda bulunmakta ve bu sayede enterokok vücutta uzak noktalara göç etmekte ve makrofaj içinde antimikrobiyal tedaviden korunmaktadır. Yapılan bir çalışmada jelatinaz, sitolizin ve Agg eksprese eden suşların nötrofil aracılı öldürme için daha dirençli olmadıkları bulunmuştur. Ancak in vitro denemelerde in vivo koşullar taklit edildiği zaman sonuçlar yukarıda bahsedilen moleküler ekspresyonları desteklememektedir. Enterokokkal yüzey protein (Esp) yapısı ile gen kodlamadaki çoklu tekrarlayan motifler *E. faecalis* infeksiyonunda immün cevapta oldukça önemlidir (Rakita ve ark 2000).

1.4.3. Konakçındaki Patolojik Değişimler

İnfeksiyon patojenezindeki son basamakta konakçıda patolojik değişimler meydana gelir. Bu tip değişimler konakçı inflamatuvar cevabı ile veya salgılanan toksin, proteaz sonucunda meydana gelen direkt doku hasarı ile uyarılmaktadır. Enterokokal lipoteikoik asit konakçı immün cevabı modüle etmede rol oynayan faktörlerden biridir ve bu asit doku hasarına neden olmaktadır. Pek çok grup lipoteikoik asitin, gram negatif bakterilerin lipopolisakkaridi kadar inflamatuvar olup farklı sitokinlerin potansiyel bir uyarıcısı olduğu bilinmektedir. Endokardit patojenezinde rol alan Agg ve enterokokal bağlayıcı maddeleri olmadan türlerin hastalık oluşturmadıkları, Agg veya enterokokal bağlayıcı maddelerden birine sahip türlerin ise enterokokal bağlayıcı maddeye yüzeyde sahip olan türlerden daha fazla hastalık oluşturma potansiyeli olduğu açıktır. Sonuç olarak *E. faecalis* tarafından salgılanan ürünler direkt doku hasarına neden olmaktadır ve bu maddeler sitolizinler ve jelatinazdır (Rakita ve ark 2000).

1.5. Virulens Faktörleri

Enterokoklar memeli hayvanların gastrointestinal sistemi içinde hem konakçı ile hem de bağırsak florasının diğer ortakları ile uyumlu olarak yaşayan kommensallerdir. Antibiyotik tedavisi, konakçı yaralanması veya azalan konakçı immunitesi gibi konakçı-kommensal ilişkisinin dinamiklerindeki düzensizlikler, bu intestinal bakterinin ekstraintestinal konakçı alanlarına erişmesine ve infeksiyon oluşturmaya olanak sağlayabilir. Enterokokların kommensal davranışlarının dışına sapmasına neden olan diğer bir mekanizma ise konakçının savunmasını aşmak için yeni özellikler kazanması ve yeni ortamlarda kolonize olmasıdır. Bu ikinci mekanizma, infeksiyon kökenli ve kommensal türler arasındaki genetik farklılıkları açıkça vurgulayan *E. faecalis*'in patojenite adasının identifikasyonundan sonra giderek zemin kazanmaktadır (Shankar ve ark 2002, Upadhyaya ve ark 2009).

Enterokoklar, birçok antibiyotiğe karşı interensek dirençli olmaları, antibiyotiklere kolaylıkla direnç gösterebilmeleri ve çevre koşullarına uyumlarının iyi olması nedeniyle diğer patojenlerden daha avantajlı olabilmektedir (Tok 2006). Yıllardır birçok çalışma enterokokal virulens ve enterokokal virulens faktörlerinin identifikasyonuna yönelmiştir (Hancock ve ark 2000).

Enterokokların en önemli virulens faktörleri

1. Sitolizin,
2. Agregasyon faktörü,
3. Ekstraselüler süperoksitler,
4. Enterokokal yüzey proteini,
5. Jelatinaz,
6. Lipoteikoik asit,
7. Kollajen Bağlayıcı Adezin MSCRAMM Ace,
8. Kapsül, hücre duvarı polisakkaritleri.
9. Antibiyotik direncidir.

1.5.1. Sitolizin

Ökaryotik ve prokaryotik hücreleri lize eden *E. faecalis* sitolizini genellikle plazmid kodludur ve hayvanlarda *E. faecalis*'in virulensini artırır (Jett ve ark 1994,

Upadhyaya ve ark 2009). Yakın zamanda sitolizin operonu, *E. faecalis*'in patojenite adasının esp genine çok yakın bir bileşeni olarak saptanmıştır (Shankar ve ark 2002). Sitolizin operonu *cyLLS*, *cyIB*, *cyIR1*, *cyIM* *cyIR2*, *cyLL*, *cyIA*, ve *cyII* olarak tanımlanan sekiz gen içermektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

Enterokokal virulense katkısı olduğu bilinen sitolizin sentezinin, quorum-sensing mekanizması yoluyla yeni iki bileşenli regülatör sistem tarafından düzenlendiği bulunmuştur. Sitolizin sistemi, klasik histidin kinaz ve yanıt regülatöründen oluşan iki bileşenli sinyal iletim sistemi ile düzenlenmemiş olduğu için eşsizdir (Haas ve ark 2002, Kayaoglu ve ark 2004).

Aminoasit analizlerine dayanarak saflaştırılan *E. faecalis* sitolizini A lantibiyotik tipi olarak sınıflandırılmaktadır. Lantibiyotikler ise; amino lantionine içeren ve normal olarak proteinlerde bulunmayan diğer modifiye olmuş aminoasitleri bulduran ribozomal olarak sentezlenmiş peptidlerdir. Diğer tip A lantibiyotik örnekleri; epidermin, nisin, subtilin ve streptococin'dir. Daha fazlası; bakteriyal hücrenin sitoplazmik membranda spor oluşturmasıyla ve yapay fosfolipid vezikülleri ile antibakteriyal aktivite göstermektedir (Portenier ve ark 2003, Karagöz 2005).

Epidemiyolojik araştırmalar sitolizinin hastalık oluşumunda rolü olduğunu kısmen desteklemektedir. Ike ve arkadaşları (1987) sağlıklı bireylerin fekal örneklerinden elde edilen *E. faecalis* izolatlarının %17'sinin hemolitik olmasına karşın, *E. faecalis*'in klinik izolatlarının yaklaşık %60'ının hemolitik olduğunu bildirmiştir. Bir başka çalışmada *cyIA*'ya, endokardit vakalarından elde edilen izolatlar ve sağlıklı bireylerin fekal izolatlarına göre bakteriyemi izolatlarında daha sık rastlanılmıştır. Buna karşılık Coque ve arkadaşları (1995) endokardit, bakteriyemi veya sağlıklı bireylerin dışkılarından elde edilen *E. faecalis* izolatları arasında sitolizin insidansı açısından herhangi bir fark saptamamıştır. *E. faecalis* klinik izolatlarının sadece %16'sının sitolizin ürettiği diğer bir çalışmada, ana virulens faktörü olarak bu proteinin rolünün küçük olduğu sonucuna varılmıştır (Elsner ve ark 2000). Başka bir çalışmada *E. faecalis*'in klinik izolatlarında bulunan sessiz *cly* genlerinin negatif fenotipik profil (kanlı agar plaklarında negatif hemolitik aktivite) verebildikleri ancak infeksiyon bölgesindeki faktörler gibi çevresel faktörlerin bu genleri aktive edebileceği ileri sürüldü (Eaton ve ark 2001). Hayvan ve nematod örneklerinden elde edilen veriler sitolizinin önemli bir virulens faktörü olduğunu

göstermektedir. Bir tavşanın endoftalmi deneyinde, doku hasarının bir sonucu olarak görme kaybının önlenmesi için *E. faecalis*'e karşı kullanılan kortikosteroid tedavisi ile birlikte antibiyotik tedavisi sitolitik türlerin infeksiyonunda işe yaramazken, non-sitolitik türlerde etkili olmuştur ki bu da sitolizin için endoftalmide patojenik bir rol öne sürmüştür (Jett ve ark 1995).

1.5.2. Agregasyon Faktörü (AF)

AF, *E. faecalis*'in feromon- indüklenabilen yüzey proteininin, kültüre edilen renal tübüler hücrelerine in vitro yapışmasına aracılık ettiği ve kültüre edilen insan bağırsak epitelyum hücreleri tarafından *E. faecalis*'in içselleştirilmesini arttırdığı gösterilmiştir (Wells ve ark 2000). İn-vivo olarak agresyon faktörü bir dizi mekanizma yoluyla enterokokal infeksiyonların patojenezine katkıda bulunabilir (Mundy ve ark 2000, Devriese ve ark 2006, Gültekin 2004, Kayaoglu ve ark 2004).

Agregasyon maddesi en az 4 farklı yönde *E. faecalis* 'in virulens belirleyicisi olarak işlev görmektedir.

i) Plazmid tarafından kodlanan virulens faktörlerinin dağılımını sağlamaktadır (türler arasında enterokokkal sitozilin ve antibiyotik determinantları gibi).

ii) Enterokokların böbrek ve bağırsak epitelyum hücrelerine bağlanmasını ve bu yüzeylerde kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Bunun sonucunda endokardit ve üriner sistem infeksiyonlarına yol açmaktadır.

iii) Ayrıca bakterinin polimorfonükleer lenfositlerin (PMN) fagositozuna karşı da korunmasını sağlamaktadır, fakat mikrobiyal ölümle sonuçlanmamaktadır. Bu koruma mekanizması belki fagozomal olgunlaşmanın modifikasyonu aracılığı ile olmuş olabilir.

iv) Son olarak; Chow ve arkadaşlarının (1993) yapmış olduğu bir çalışma, agregasyon maddesinin ve sitolizinin, sitolizin regülasyonunu düzenleyen quorum sensing mekanizmasını aktifleştirerek virulensi arttıran sinerjistik bir işleve sahip olduklarını göstermiştir. Bu da doku zararı ve daha derin doku işgali ile sonuçlanmaktadır (Portenier ve ark 2003).

E. faecalis patogeneğinde AF'nün rolüne ilişkin hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar çeşitlidir. Tavşanlarla yapılan çalışmalarda AF endokarditi arttırmıştır ancak rat endokardit örneğinde durum böyle olmamıştır ve AF tavşan endoftalmi hastalığının

şiddetini etkilememiştir. *E. faecalis* tarafından endokarditin arttırılması konusu, bakteriyel adezin ve konakçı hedefi arasında bir etkileşimin genel kapsamında izlenebilir. Tüm memeli dokularının ekstrasellüler matriksi glikoproteinlerden (kollajen, laminin, fibronektin gibi) oluşur ve proteoglikanlar mikroorganizmalar tarafından kolonizasyon ve infeksiyonun başlatılması için kullanılabilir. Bakterinin kollajene bağlanma yeteneğinin endokardit patogeneğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, AF'nün klinik izolatlardan sıklıkla tespit edilmesi ancak sağlıklı bireylerin fekal izolatlarında nadiren bulunması, insan enterokokal infeksiyonlarında AF'ün olası rolünü akla getirmektedir (Kayaoglu ve ark 2004).

1.5.3. Ekstrasellüler Süperoksit

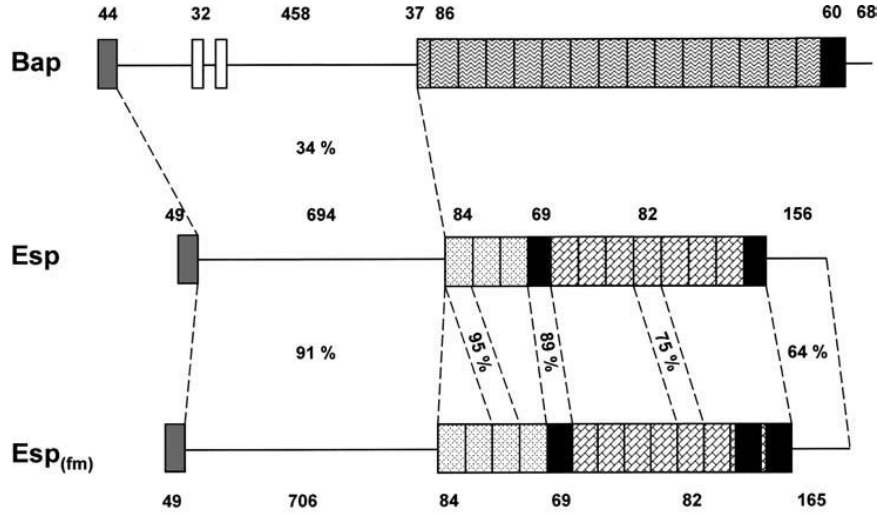
Enterokoklar önemli miktarda süperoksit üretme yetenekleriyle benzersizdir ve bu özellik kandan elde edilen *E. faecalis* izolatları ile daha fazla ilişkili görünmektedir (Tendolkar ve ark 2003, Upadhyaya ve ark 2009). Ekstrasellüler süperoksit üretimlerinin, invaziv olan izolatlarda genel izolatlardan çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Portenier ve ark 2003).

Süperoksit anyonun aynı zamanda osteoklastlar tarafından üretildiği ve kemik erimesinde yer aldığı bildirilmiştir (Key ve ark 1994). Ayrıca süperoksit anyon, plazmada nötrofiller için kemotaktik faktör olan bir öncü ile reaksiyona girebilir (Petrone ve ark 1980, Cross ve ark 1987).

E. faecalis tarafından üretilen süperoksitin biyokimyasal yolu en son, rat kolonunda bulunan yabani-tip *E. faecalis*'in süperoksit üretiminin sergilenmesi ile karakterize olmuştur. Çin hamsteri'nin ovaryum hücreleri ve HT-29 enterositler, süperoksit üreten yabani tip *E. faecalis* OG1RF ile inkübasyonları sonrasında artan DNA hasarı gösterirken, süperoksit üretimi zayıflatılmış bir izogenik mutant ile inkübasyon aynı sonucu vermemiştir. Benzer bir çalışma rat bağırsağında kolonize olan *E. faecalis*'in hidroksil radikal üretimini göstermiştir. Bu sonuçlar *E. faecalis*'in intestinal epitelyumda oksidatif stres için güçlü bir kaynak olduğunu ve belki de epitelyumdan bakteri translokasyonunda süperoksit üretiminin bir rolü olduğunu veya intestinal polipler ve kolorektal kanser ile ilişkilendirilen kromozomal istikrarsızlığa katkısına işaret etmektedir (Tendolkar ve ark 2003).

1.5.4. Enterokokal Yüzey Proteini

Enterokokal yüzey proteini Esp, 1873 aminoasitten oluşur. Çekirdek bölgesinin yaklaşık %50'si proteinden oluşmuştur ve ardışık tekrarlayan farklı birimlerden oluşan benzersiz bir mimariye sahiptir (Tendolkar ve ark 2003).



Şekil 1.4. *E. faecalis* (Esp) ve *E. faecium* (Esp_(fm)) un Esp yüzey proteini ile *S. aureus*'un Bap biyofilm ilişkili proteini arasındaki benzerliklerin şematik görünümü.

Her bir etki ya da tekrarlama birimi içindeki aminoasit kalıntıları, bitişik numaralar ile gösterilmiştir. Benzerlik alanları noktali çizgilerle gösterilmiştir ve yüzde benzerlik değerlerini kapsamaktadır (Tendolkar ve ark 2003).

Karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı sağlarken, iç kısım moleküle uzayıp kısalabilme yeteneği kazandırır. Bu proteinin, bakterinin immün sisteminden kaçmasını kolaylaştırdığı sanılmaktadır (Gültekin 2004). Esp, *Streptococcus pyogenes* R28, *Streptococcus agalactiae* Rib, C alpha protein ve *Staphylococcus aureus* biofilm-ilişkili protein (Bap) ile genel yapısal benzerlikler gösterir (Tendolkar ve ark 2003).

E. faecalis'de infeksiyona neden olan esp proteini yine bu *esp* geni tarafından kodlanmaktadır ve bu genin daha az patojen olan suşlarda bulunmadığı da gösterilmiştir. Bu gözlem, *E. faecalis*'de bir virulens faktörü olarak işlev gördüğünü ileri sürmektedir. (Upadhyaya ve ark 2009, Kayaoglu ve ark 2004).

Toledo-Arana ve arkadaşları (2001), *E. faecalis*'de esp ve biyofilm oluşumu arasında bir ilişki bulunduğunu da göstermişlerdir. Onlar ayrıca; Esp yönünden defektli olan *E. faecalis* suşlarının esp ve adhezinlerin genetik bir ilişkisinin olduğunu gösteren bir biyofilm oluşturabileceklerini de göstermişlerdir. Ayrıca; esp'nin bağlanma aktivitesinde veya diğer moleküllerin bağlanma modülasyonunda indirekt bir etkiye sahip oldukları da düşünülmektedir. Shanker ve arkadaşları (1999), esp varlığının hidrofobik özelliğin artısından ve hidrofobik özellikleri kolaylaştırmasından sorumlu olabileceğini öne sürmektedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yüzey proteini olan esp 'nin varlığı; hidrofobik özelliğin, biofilm oluşumunun ve biyotik yüzeyde tutunmasının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Portenier ve ark 2003).

1.5.5. Jelatinaz

Bakteriyal proteazların temel fonksiyonu; organizmaya peptid nutrientlerini sağlamaktır. Fakat; proteazların konak dokularına indirekt olarak zarar verebilmesi ve virulens faktörü olarak da sınıflandırılabilmesi mümkündür. *E. faecalis* için salgılanabilen iki proteaz tanımlanmıştır: jelatinaz ve bir serin proteaz'dır (Portenier ve ark 2003). İlk olarak Bleiweis ve Zimmerman (1964) tarafından tanımlanan ve *E. faecalis*'ten saflaştırılan jelatinaz, çinko ihtiva eden ekstrasellüler bir metalloproteinazdır. Fakat, bu *E. faecalis* metalloproteinazları insan endotelyumlarını inaktif etmesi sebebiyle coccolysin olarak tekrar isimlendirmiştir. Yine de jelatinaz çoğu çalışmada genellikle kullanılan bir terimdir (Portenier ve ark 2003).

Yapılan bir çalışmada; *E. faecalis* olan hastane izolatlarının %45'inin jelatinaz ürettiği oysa hiçbir *E. faecium* ve *E. avium* izolatının jelatinaz pozitif olmadığı gözlemlenmiştir (Portenier ve ark 2003).

Gıdalardaki *E. faecalis* suşlarında da jelatinaz üretimi yüksektir. Çalışmalarda genotipte jelatinaz geninin bulunmasına karşılık fenotipte bu özelliği göstermeyen bazı suşların olduğu belirlenmiştir (Özmen ve ark 2011).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar jelatinaz üreten *E. faecalis* suşunun, yetersiz jelatinaz üretimi olan izogenik suş ile kıyaslandığında artan letal etkisini göstermektedir. *E. faecalis*'in insan klinik izolatları (çeşitli bölgelerindeki infeksiyonlar nedeniyle hastanede

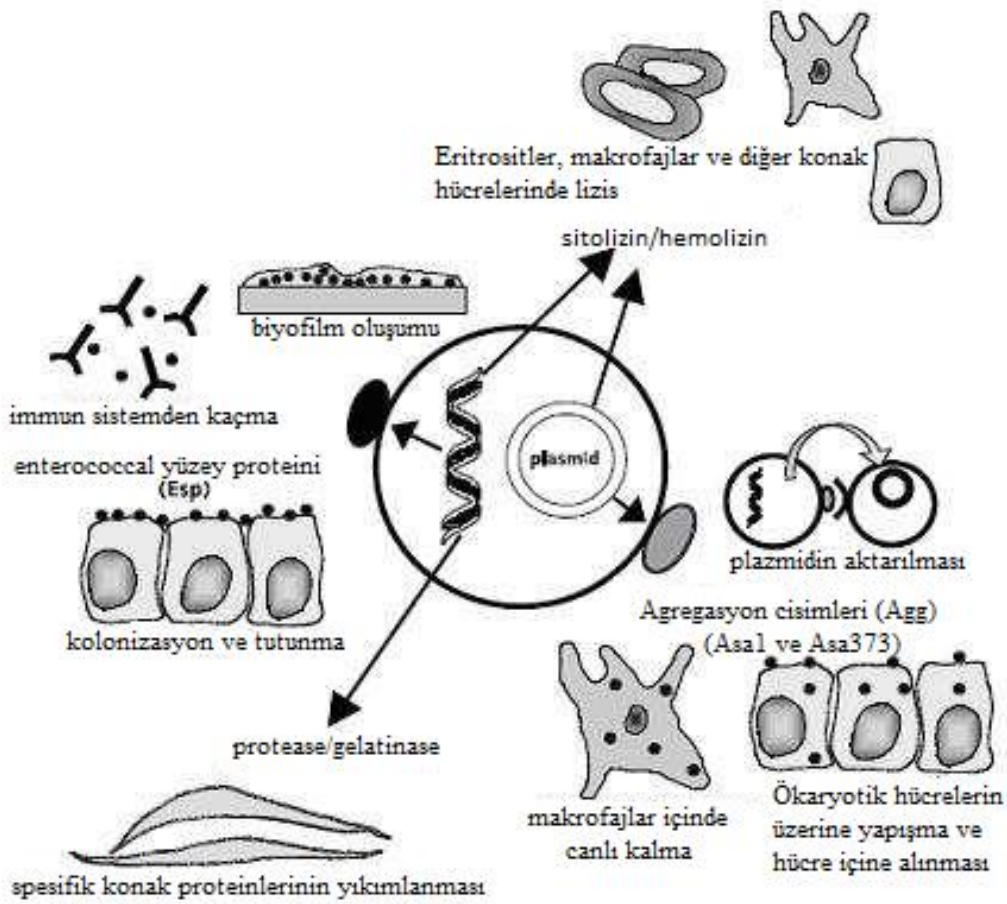
yatan hastalardan izole edilen) ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarında jelatinaz üretimi, izolatların %45-68'inde tespit edilmiştir ve jelatinaz aktivitesinin klinik izolatlarda, sağlıklı bireylerin fekal izolatlarından daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Kayaoglu ve ark 2004).

1.5.6. Lipoteikoik Asit (LTA)

Prokaryotik organizmalar, hidrofobik glikolipid kuyruğuna bir ester bağı ile bağlanmış olan hidrofilik poligliserolfosfat omurgadan oluşan amfipatik polimerlerdir. Enterokoklar için bu yüzey molekülleri D grup antijen ile denk gösterilmiştir. Tek bir organizma içinde lipoteikoik asitler, glikofosfat zincirleri ile birlikte mikroheterojen türler olarak varlığını sürdürürler. Enterokokal lipoteikoik asitlerin çeşitli biyolojik özellikleri araştırılmıştır. Beachey ve arkadaşları (1979) enterokokal lipoteikoik asitin, *S. pyogenes* lipoteikoik asiti gibi geri dönüşümlü olarak insan eritrositlerine bağlandığını kaydetmiştir. Lipoteikoik asitin açıl kısmı bağlanması için gereklidir. Lipoteikoik asit *S. pyogenes*'den bağımsız büyüme döngüsü aşamasında sürekli olarak salgınır ancak enterokoklarda da salgınır salgınmadığı bilinmemektedir. Bu bilgiler lokal inflamatuvar süreci ile ilgili olabilir çünkü ökaryotik hücrelerde lipoteikoik asit bağları antijenik özelliği korur. Bunun sonucunda bu hücreler plazmaya maruz kaldığında, komplement aracılı lizise uğrayabilir. Muhtemelen, bakteriyel lipoteikoik asitle ilişkili olarak konakçı hücre membranı tarafından komplementin aktivasyonu ile infeksiyon bölgelerinde doku hasarı ortaya çıkabilir (Hummell ve ark 1986).

Bhakdi ve arkadaşları (1991), insan monositlerinden kültüre edilen interlökin-1B, interlökin-6 ve tümör nekroz faktör alfa üretimini uyarmak için klinik olarak önemli gram pozitif organizmalardaki lipoteikoik asitin yeteneğini test etmişlerdir. İlginç bir şekilde, çeşitli enterokokal türlerin konsantrasyonları 0,5- 5,0 ug/ml arasında olan lipoteikoik asitlerinin, her üç monokinin salınımını indüklerken, *S. aureus* ve *S. pneumoniae* lipoteikoik asitlerinin monokin üretimini indüklemeye başarısız olduğunu gözlemlemişlerdir. Enterokokal lipoteikoik asit tarafından uyarılan monokin seviyeleri, gram negatif lipopolisakkaritlerine maruz kaldıktan sonra gözlenenlere benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, Tsutsui ve arkadaşları (1991) enterokokal lipoteikoik asitin tümör nekroz faktör ve interferonlar için güçlü bir indükleyici olduğunu bulmuştur.

Son olarak LTA, verici hücre tarafından üretilen agregasyon maddesi için alıcı hücre üzerinde reseptör görevi yapan *E. faecalis*'in bağlayıcı maddesinin bir bileşeni olarak kabul edilmiştir. Bu varsayım *E. faecalis*'ten izole edilen serbest LTA'nın, hücrel bağlanma maddesinin rekabetçi bir inhibitörü olarak hareket ederek feromon-kaynaklı hücre kümelenmesini inhibe etmesi deneylerinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla LTA, kümelenme formasyonunu ve plazmid transferini kolaylaştırmak yoluyla *E. faecalis*'in virulensine katkısı olan bir molekül olarak kabul edilebilir (Kayaoglu ve ark 2004).



Şekil 1.5. Patojenitede rol oynayan farklı virulens faktörlerinin şematik gösterimi (Çetinel Aksoy 2008)

1.5.7. Kollajen Bağlayıcı Adezin MSCRAMM Ace

Ace enterokok üzerinde bir MSCRAMM kollajen bağlayıcı olup, yapısal ve fonksiyonel olarak stafilokokal Cna adezin ile ilintilidir. Ace, *E. faecalis*'in kommensal ve patojenik izolatları arasında yaygın olup, insanlarda infeksiyon süresince salınır ve insandan türetilmiş antikolar ekstrasellüler matriks proteinlerinin in vitro uyumunu bloke edebilir. Ace geninin intragenik bir probu, test edilen tüm *E. faecalis* izolatlarına özel hibridizasyonlar göstermiştir ve enterokokları sınıflandırmak için bir araç olarak öne sürülmüştür. Son dönemde, Ace'in X-ışını kristalografik analizi rapor edilmiştir. Ace, ekstrasellüler bir matriks bileşeni olan tip-I kollajene bağlanmaya aracılık ederken gösterilmiştir (Tendolkar ve ark 2003).

Nallapareddy ve arkadaşları (2000), *E. faecalis* suşunda, OG1RF, Ace mutantının, kollajen tip I ve IV ve laminini, yabancı tipe kıyasla çok daha düşük seviyelerde bağladığını gösterdi. Fakat bu bağlama *E. faecalis* hücreleri 37°C'de kültüre edildiğinde değil de, yalnızca 46°C'de kültüre edildiğinde gözlemlendi. Anti-Ace antikoları kullanıldığında Ace, enterokokal endokarditli hasta serum örneklerinin % 90'ında saptandı ki bu da Ace'in in vivo ortaya çıktığını akla getirmektedir. İn vivo ace varlığını düzenliyor olabilecek konakçı faktörleri henüz tespit edilmemiştir. Yakın zamanda, *E. faecium*'dan Acm denen bir Ace homologu tespit edilmiştir ve Ace ile aynı tür yapı sergilemektedir. Acm, Ace proteinine sadece A alanı içinde benzerlik gösterirken, A ve B alanları içinde *S. aureus* kollajen bağlayıcı adezini Cna'e çok daha fazla benzerlik göstermektedir. İşlevsel olarak, Acm, *E. faecium*'u kollajene bağlayabilmek için birincil sorumlu adhezin olarak gösterilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca acm geni barındıran 32 *E. faecium* izolatının 32'si de test edilmiş olmasına rağmen, bunlardan bazılarında kollajen bağlayıcı fenotip gözlenmemiştir (Tendolkar ve ark 2003).

1.5.8. Kapsül, Hücre Duvarı Polisakkaritleri

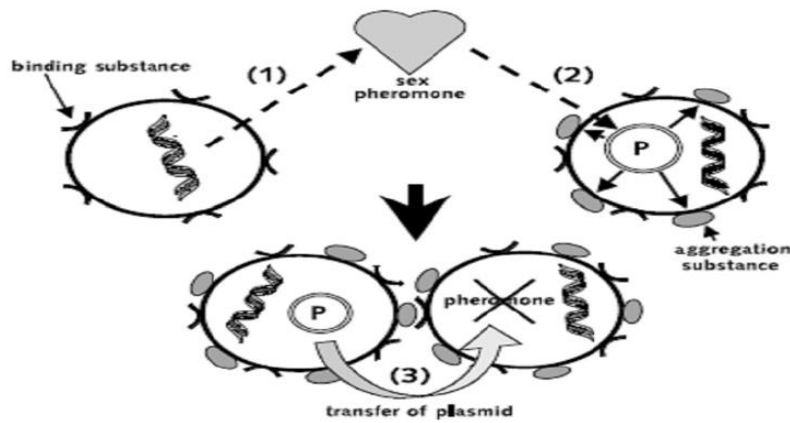
Karmaşıklığı ve fagositoza karşı direnç oluşturma yetenekleri sayesinde konakçı immun sisteminden kaçabilen bakteriyel kapsül bileşenleri, patojenik süreçte ciddi bir role sahiptir. Bu bileşenlerin antijenitesi, antibakteriyel aşı geliştirmek için onları cazip kılmaktadır. Operondaki genlerin insersiyonel inaktivasyonu, in vitro fagositik ölüm için gelişmiş duyarlılığı olan izogenik *cps*-negatif mutantlarla sonuçlanmıştır. *E. faecalis* ve *E.*

faecium'un her ikisinin de yüzeyinde bulunan bir ikinci kapsül polisakkarit de saflaştırılmış ve kimyasal olarak karakterize edilmiştir. Saflaştırılan karbonhidrat fraksiyonu bileşimsel ve immunolojik olarak yukarıda açıklanandan ayrılır ve bu fraksiyon için oluşan antikorlar nötrofil aracılı fagositoz deneyinde opsonik aktivite göstermiştir. Bu antikorların koruyucu etkinliği, enterokokal infeksiyonların önlenmesi için bu antikorların yararlı olabileceğini öne süren daha sonraki bir çalışmada fare infeksiyon örneği kullanılarak gösterilmiştir (Tendolkar ve ark 2003).

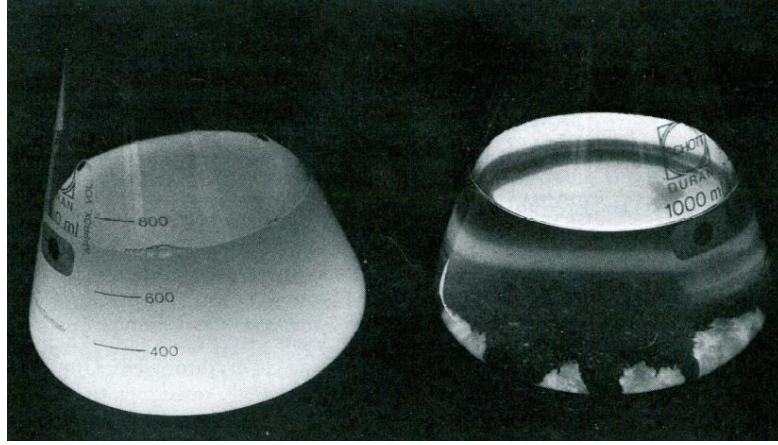
Xu ve arkadaşları (2000) tarafından tanımlanmış ve karakterize edilen, ramnoz ihtiva eden bir polisakkariti kodlayan gen kümesi, enterokokal polisakkarit antijeni (*epa*) olarak adlandırılmıştır. Bu polisakkariti kodlayan genetik belirleyici, *epa* gen kümesi denen 17 bitişik gen takımındadır. *Orfde4* ve *orfde6* genlerindeki bozulmalar, peritonitisli fare örneğinin ölmesinde istatistiksel olarak önemli bir gecikmeyle sonuçlanmıştır ki bu durum bu polisakkaritin virulens faktörü olarak olası rolünü düşündürmektedir.

1.5.9. Seks Feromonları

Antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virulens faktörleri seks feromon sistemi ile *E. faecalis* suşları arasında yayılabilir. Bazı *E. faecalis* seks feromonları ve bunların inhibitör peptitleri, insan ve rat nötrofilleri için kemotaktiktir, süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükler ve doku hasarı oluşturur (Kayaoğlu ve ark 2004).



Şekil 1.6. Seks-feromon sistemi transfer mekanizması



Şekil 1.7. Seks feromonu ile indüklenen kümelenme fenomeninin gösterimi.

E. faecalis kültürünü içeren soldaki erlen bir cinsiyet feromonu taşır, fakat cinsiyet feromonu ile indüklenmemektedir. Sağda gösterilen erlendeki kültür, cinsiyet feromon plasmidini içerir ve çaprazlanmış cinsiyet feromonu ile indüklenmektedir. Solda gösterilen erlendeki kültür kümeleri, sağdaki kültürde daha geniş kümeler halinde görülmektedir (Çetinel Aksoy 2008).

1.5.10. Hyaluronidaz

Başka mikroorganizmalarda hyaluronidaz üzerine yapılan çalışmalar, bu enzimin dolaylı olarak enterokok virulensine katkı sağladığını göstermiştir. Mikroorganizmalar tarafından hyaluronidaz üretiminin tespiti, hyaluronik asit içeren yarı katı ortama inokülasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Unsworth hyaluronidaz üreten *Streptococcus milleri* suşlarına, normal floranın bir parçası olan suşlara oranla (% 25), apselerde daha sık (% 85) rastlamıştır. Pnömonokokal hyaluronidazın, bir hayvanın orta kulak infeksiyonunda rol aldığı gözlenmiştir. Buna ek olarak, kutanöz larva migransında *Ancylostoma duodenale* (kancalı kurt) için bir yayılma faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu örnekler enterokokal hyaluronidazın, invaziv hastalıklarda rol oynadığını göstermektedir (Jett ve ark 1994, Kayaoglu ve ark 2004).

1.5.11. AS-48

E. faecalis tarafından üretilen AS-48, enterokoklar da dahil olmak üzere geniş spektrumda gram pozitif ve gram negatif bakterileri inhibe ve lize eder. Bu basit peptit, hedef hücrelerin sitoplazmik membranlarında gözenek oluşturma yoluyla litik aktivite

gösterir. Ayrıca otolizin aktivitesi yoluyla seçilen bir enterokokun lizisini indüklediği görünmektedir. AS-48, sitolizin operonunda olduğu gibi aktarılabılır plazmid tarafından kodlanmıştır. Bu bakteriyosinin önemi belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte insan kommensal ve infeksiyon izolatları arasında AS-48 üreten suşların prevalansı henüz açıklanmamıştır. AS-48'in ökaryotik hücre membranına karşı herhangi bir aktivitesi bildirilmemiştir (Jett ve ark 1994).

1.5.12. Antibiyotik Direnci

Enterokokların çoğu doğal olarak; β -laktamlar, klindamisin, düşük konsantrasyonda aminoglikozid ve florokinolonlar gibi antimikrobilyallere direnç göstermektedirler. Doğal olarak ampisilin ve vankomisine duyarlıdır, fakat bu antibiyotiklere maruz kaldıklarında direnç geliştirmektedirler. Ayrıca; tetrasiklinlere, makrolid, glikopeptidlere (vankomisin ve teikoplanin) kloramfenikol ve yüksek düzeydeki aminoglikozidler kadar β -laktamlara direnç geliştirebilirler. Antibiyotik direncinin kazanılması; plazmidlerde bu direnç genlerinin kazanılması ve diğer mikroorganizmalardan kazanılan transpozonlar sayesinde oluşmaktadır. Enterokoklar; yüzey agregasyon maddesinin sentezini etkileyen feromonları salgılayabilirler. Bu kolaylık; plazmid tarafından taşınan direncin değişmesine yol açacak olan eşleşme agregasyonunun oluşumuna ve iki hücre arasında ilişki kurulmasına neden olmaktadır. Enterokoklar antimikrobiyal ilaçlara çoklu direnç gösterdiği için çok fazla dikkat toplamaktadır. Bu belki de nozokomiyal infeksiyonların hakimiyeti için iyi bir açıklama olabilmektedir (Çetinel 2008, Aktaş ve ark 2009).

1.5.12.1. β -Laktam direnci

Enterokokların beta-laktam antibiyotiklereiki farklı mekanizma ile direnç geliştirdiği saptanmıştır. Bunlardan biri *E. faecium* suşlarında görülen, kromozomal olan ve penisilin afinitesinin azalması sonucu PBP 5'in miktarının artması ile ortaya çıkan dirençtir. Bu mekanizmanın prensibi, üremelerini inhibe edecek konsantrasyondaki β -laktam antibiyotiklerinin varlığında, onlara düşük bağlanma gösteren düşük molekül ağırlıklı PBP5 sentezleyebilmeleridir. Bu sentez PBP değişikliklerini kodlayan DNA bölgesinde meydana gelen mutasyon sonucu veya plazmid kazanımı ile oluşmaktadır. İkinci direnç mekanizması ise beta-laktamaz üretimidir. Beta laktamazlar antimikrobiyel maddenin hedef bölgeye ulaşmadan modifiye edilmesine veya parçalanmasına yol açarlar.

Beta laktamaz üreten ilk suş 1981 yılında ABD’de tanımlanmıştır (Marothi ve ark 2005, Klare ve ark 2003).

1.5.12.2. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozitlere karşı kromozomal mutasyon sonucunda membrandaki permeabilitenin azalması ile oluşan direnç yüksek düzeyde değildir. Aminoglikozitlere karşı oluşan direnç çapraz direnç şeklindedir. Bu tip direnç β -laktam antibiyotikler ile ortadan kaldırılabılır (Tok 2006).

1.5.13. Kazanılmış direnç

Enterokoklar plazmid ve transpozonlar yoluyla son yıllarda belirgin bir şekilde kazanılmış direnç geliştirmiştir. Bunlar arasında en önemli olanları yüksek düzey aminoglikozit direnci, beta laktamaz yapımı veya diğer mekanizmalarla gelişen yüksek düzey penisilin direncidir. Enterokokların çok önemli bir kısmı bu yol ile eritromisin, klindamisin ve tetrasiklinlere direnç kazanmış durumdadır (Marothi ve ark 2005).

1.5.13.1. Glikopeptit direnci

Enterokoklarda glikopeptit direnci, Van A’dan Van G’ye kadar çeşitlilik gösterebilen farklı direnç fenotipleri ile ifade edilir. Fenotipik sınıflandırmada; bakterinin sadece vankomisin ya da hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli olması, direncin indüklenebilir veya yapısal olması ve diğer bakterilere geçirilebilir olup olmamasına göre yapılır. Bu glikopeptit direnç tipleri içerisinde en iyi tanımlanmış olanları VanA, VanB, VanC ve VanD dirençleridir (Çizelge 1.2.) (Klare ve ark 2003).

Çizelge 1.2. Enterokoklarda glikopeptit direnç tipleri (Dutka-Malen ve ark 1994)

Ozellik	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE
MIK(µg/mL) Vankomisin Teikoplanin	64 ->1000 16 ->512	4 ->1000 0.5 -> 32	2 - 32 0.5 - 1	16 - 64 2 - 4	16 0.5
Transfer edilebilme	+	+	-	-	?
Direnç genlerinin lokasyonu	Plazmidler	Kromozom (plazmidler)	Kromozom	Kromozom	Kromozom
İndüklenme ile ekspresyon					
Vankomisin Teikoplanin	+ +	+ -	- -	+ -	+ -
Hareketli element	Tn 1546	Tn 1547	-	?	?
Ligaz geni	<i>van A</i>	<i>van B</i>	<i>van C-1 ve van C-2/van C-3</i>	<i>van D</i>	<i>van E</i>
Direnç tipi	Kazanılmış Direnç	Kazanılmış Direnç	Doğal Direnç	Kazanılmış Direnç	Kazanılmış Direnç
Direnç proteinin M.A'lığı(kDa)	39-40	39.5	38	?	?
Modifiye edilmiş hedef	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser
Türler	<i>E. faecalis</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. faecium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. durans</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>

1.6. Enterokok İnfeksiyonlarında Tanı

Enterokok türlerinin % 80'i Lancefield Grup D antijenine karşı hazırlanan antiserumlarla reaksiyon verir. Fakat çoğu Enterokok safralı ortamda eskulini parçalar, % 6.5'lük NaCl besiyerinde ürer, PYR (+)'tir. Klinik örneklerden en çok saptanan edilen 2 tür *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. Facklam ve ark (1998), Enterokok identifikasyonu için bir baPak metodu geliştirmişlerdir. Enterokokları sorboz ve mannitol besiyerinde asit oluşturmasına ve arjinin hidrolizine göre beş gruba ayırmışlardır. Listedeki determinantlara uyan izolatlar birkaç besiyerine pasajlanmak suretiyle ilgili biyokimyasal testler uygulanır.

Son olarak daha önce kullanılan testlere MGP (methyl-Dglukoyranoside) ve EFRO (Efrotomycin disk 100 mcg) eklenmiştir. *E. malodoratus*, *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* ve *E. saccharolyticus* türleri sorbitol, mannitol, ve sorboz sıvı besiyerinde asit yapar ama arjinini parçalamaz. *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, ve *E. gallinorum* ise mannitol sıvı besiyerinde asit oluşturur, arjinini parçalar, fakat sorboz sıvı besiyerinde asit yapmaz, sorbitolde ise değişken reaksiyon verirler. *E. durans*, *E. hirae* ve *E. dispar* arjinini parçalar, fakat 3 karbonhidrattan asit oluşturmaz (Di Rosa ve ark 2000).

E. faecalis suşları % 0.04 potasyum tellurite karşı tolerans gösterir ve agarda siyah koloniler oluşturur. Bazı *E. casseliflavus*, *E. gallinorum* ve *E. mundtii* türleri de tellurite toleranslıdır. Motilite ve hareket sarı pigment oluşumu *E. faecalis* ve *E. faecium* dışındaki türleri ayırmada kullanılır. *E. casseliflavus* hareketlidir, sarı pigment oluşturur. *E. mundtii* de sarı pigment yapar ama hareketsizdir. *E. gallinorum* hareketlidir ama sarı pigment oluşturmaz. *E. sulfureus*, hareketsiz ancak pigment oluşturan bu grup organizma, grup D antijeni içermez ve mannitol, arabinoz, inulin, ve arjinin testlerinde negatiftir. Grup V, *E. columbae* ve *Vagococcus*'dan oluşur. Enterokok identifikasyonunda konvansiyonel yöntemlerin yanında biyokimyasal metotlar için Brain Heart İnfüzyon temelli besiyerleri kullanılır. Arjinin deaminasyonu için Moeller'in dekarboksilaz besiyeri, hareket için ise yarı katı besiyeri kullanılır. Herhangi bir kanlı agar da Enterokok izole etmek için kullanılabilir. Ford ve arkadaşları, *E. faecium*'un gaitadan izolasyonu için Sefaleksim-Aztreonam-Arabinoz agarı (CCA agar) ortaya koymuşlardır. Gram negatif bakteri içeren karışık klinik örneklerden izolasyon için azid içeren Safra-eskulin-azid veya Enterococcosel agar kullanılır. CNA (Columbia kolistin-nalidiksik azid agar) veya PEA (fenil etil alkol agar) da bu amaçla kullanılabilir. VRE tespiti içinse genellikle 6 mcg/ml vankomisin içeren Enterococcosel sıvı besiyeri veya BHI agar kullanılır (Hallgren ve ark 2000).

Çoğu laboratuvarında identifikasyon için hızlı tanı sistemleri kullanılmaktadır. RAPID ID32 System, RAPID STR, API Rapid System, VITEK Gram Pozitif İdentifikasyon (GPI) Kartları, Micro Scan G pozitif Breakpoint Combo Panel bunlardan bazılarıdır. Enterokok türlerinin moleküler yöntemlerle identifikasyonunda PCR, DNA hibridizasyon, ribotiplendirme, pulsed field jel elektroforezi (PGFE) gibi yöntemler kullanılır. Bunlar arasında en faydalı ve güvenilir metot PGFE olarak tavsiye edilmektedir (Kawalec ve ark 2000).

Enterokokların tür ve genotip tayininde PCR teknikleri başarı ile kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda enterokoklardaki “elongasyon faktör” olarak da adlandırılan *tuf* genini (*EF-Tu*) hedef alan primerler, bakteriyi cins düzeyinde tanımladığında (Ke ve ark., 1999), D-alanin/ D-ligaz geni (*ddl*) (Dutka –Malen ve ark., 1995) hedef alan primerler de bakterinin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Enterokoklardaki antibiyotik direncinin tespiti için uygulanan duyarlılık testleri yanında suşlar arasında genetik madde transferine bağlı vertikal yayılan direnç genlerinin veya gen mutasyonları nedeniyle gerçekleşen klonal ilişkinin de moleküler yöntemlerle ortaya konulabilmesi mümkün olmuştur. Konu ile ilgili olarak Dutka-Malen ve ark (1995) *ddl* genini hedef alan primerler ile Enterokokların hem tür düzeyinde tanımlanmasını hem de glikopeptid direncinin ortaya konulmasında PCR tekniklerini kullanmışlardır.

1.7. Enterokok İnfeksiyonlarının Tedavisi

Enterokok kaynaklı infeksiyonların tedavisi, hem bu etkenlerin antimikrobiyellere dirençli olduklarından, hem de laboratuvarlarda gerçek ve spesifik duyarlılıklarının saptanması için güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmasından dolayı, karışık ve zahmetli olmaktadır. Konvansiyonel duyarlılık testleriyle penisilin-aminoglikozid sinerjizmi, betalaktamaz üreten suşların ampisilin ve penisilin direnci belirlenmemektedir. Bu nedenden dolayı laboratuvarlarda Enterokokların beta laktamaz varlığı belirlenmelidir. Penisilin veya ampisilin gibi Enterokoklara bakteriyostatik etkili ajanlar, bakterisid tedavinin gerekmediği üriner sistem infeksiyon, peritonitis, yumuşak doku infeksiyonlarının tedavisinde ilk seçilen ilaçlar olmaya devam etmektedir. Glikopeptidler, penisilin intoleransı varlığında veya *E. faecium* gibi yüksek düzeyde penisilin direnci olan suşlarda tercih edilmektedir. Ofloksasin ve Siprofloksasin gibi kinolonlar, Enterokoklara in vitro etkili olup bazı üriner infeksiyonlarda kullanılırlarsa da genelde etkilerine güvenilmez ve sistemik infeksiyonlarda ilk tercih edilecek ajanlar olmamaktadır. Bunun yanı sıra siprofloksasin direnci de giderek artmaktadır. Levofloksasin, grepofloksasin, sparfloksasin, travofloksasin gibi yeni kinolonların dirençli suşlarda etkinlikleri sınırlıdır. Enterokoklar sıklıkla miks intraabdominal infeksiyonlardan izole edilmektedir fakat, antiEnterokokal etkisi olmayan ilaçlarla yapılan tedavilerden sonuç alınabilmektedir. Bu yüzden başlangıçta spesifik antiEnterokokal antibiyotikler önerilmemektedir. Klinik düzelme olmayıp inatçı pozitiflik olgularında spesifik tedavi uygulanır (Paberza ve ark 2000, Henwood ve ark 2000).

Araştırmamızda kedilerden elde edilen *E. faecalis* izolatlarında *esp* geninin varlığı ve antibiyotik duyarlılığı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Enterokoklarda yüksek düzeyde gentamisin direnci (HLGR) genellikle bifonksiyonel AAC(6')-APH(2'') aminoglikozid-modifiye eden enzim varlığı nedeniyledir. HLGR *Enterococcus* türleri, endokardit gibi çeşitli enterokokal enfeksiyonlar için antibiyotik tedavisi ile ilgili endişeye neden olmuştur çünkü vankomisin veya ampisilin gibi hücre duvarı aktif antibiyotikler ile sinerji artık beklenmemektedir. Aynı türe ait hayvanlarda antibiyotik dirençli enterokokların dağılımlı da, bu türlerin hayvanlardan insanlara bulaşması veya hastanelerde hayvanlar arasında kontaminasyon oluşması endişesi ile incelenmiştir. Ancak hayvan kökenli enterokoklarda yüksek derecede gentamisin direncinin, *esp* geninin varlığı ile anlamlı bir ilişkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu nedenle aynı türe ait hayvanlardan elde edilen *Enterococcus* izolatlarında *esp* geninin varlığı ve gentamisin direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Örnek Toplanması

Araştırmamız için Aydın ve İzmir illerinde bulunan veteriner kliniklerine muayene için getirilmiş olan kedilerden alınan 130 adet rektal svap örneği, soğuk zincirde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirilmiştir. Araştırmamız için ADÜ-HADYEK'den 08.10.2013 tarih ve IX. Oturum 64583101/2013/103 sayılı yazı ile etik kurul izni alınmıştır.

2.2. İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları

2.2.1. Besiyerleri

Örneklerin izolasyon ve identifikasyon çalışmalarında, Brain Heart Infusion Agar (Oxoid®), Brain Heart Infusion Broth (Oxoid), Kanlı Agar, Müller Hinton Agar (Oxoid®) ve Enterocococel Agar (Difco®) besi yerleri kullanıldı. Üretici firmalarının önerileri doğrultusunda hazırlanan besi yerleri sterilite kontrolü yapılarak (bir gece 37 °C'de bekletildikten sonra) kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı.

2.2.1.1. Brain Heart Infusion Agar

Brain Heart Infusion Agar (OXOID)

Beyin Ekstraktı 12.5 g

Kalp Ekstraktı 5.0 g

Pepton 10.0 g

D (+) glikoz 2.0 g

Sodyum Klorür 5.0 g

Di Sodyum Fosfat 2.5 g

Agar 10.0 g

Toplam: 37 g/L

Ticari besiyeri 1 L. distile suya ilave edilip eritildi. pH değeri 7.4 ± 0.2 'ye ayarlandı.

121°C'de 15 dk. otoklavda sterilize edildi ve steril petri kutularına döküldü.

2.2.1.2. Brain Heart Infusion Broth

Brain Heart Infusion Broth (OXOID)

Beyin Ekstraktı 12.5 g

Kalp Ekstraktı 5.0 g

Pepton 10.0 g

D (+) glikoz 2.0 g

Sodyum Klorür 5.0 g

Di Sodyum Fosfat 2.5 g

Toplam: 37 g/L.

Ticari besiyeri 1 L. distile suya ilave edilip eritildi. pH degeri 7.4 ± 0.2 'ye ayarlandı. 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilize edildi ve steril petri kutularına döküldü.

2.2.1.3. Enterococcosel Agar

Enterococcosel Agar (Bile Esculin Azide Agar) (DIFCO)

Pankreatik Kazein 17.0 g

Hayvansal Pepton 3.0 g

Maya Ekstraktı 5.0 g

Oxgall 10.0 g

Sodyum Klorür 5.0 g

Sodyum Sitrat 1.0 g

Eskulin 1.0 g

Demir (III) Amonyum Sitrat 0.5 g

Sodyum Azid 0.25 g

Agar 13.5 g

Toplam : 56 g/L.

Ticari besiyerine 1 L. distile su ilave edilip eritildi. Ph değeri 7.2 ± 0.2 ' ye ayarlandı. Otoklavda 121 °C 'de 15 dk. sterilize edildi ve steril petri kutularına döküldü.

2.2.1.4. Müller Hinton Agar

Müller-Hinton Broth (Oxoid, UK)

Et ekstraktı 30 g

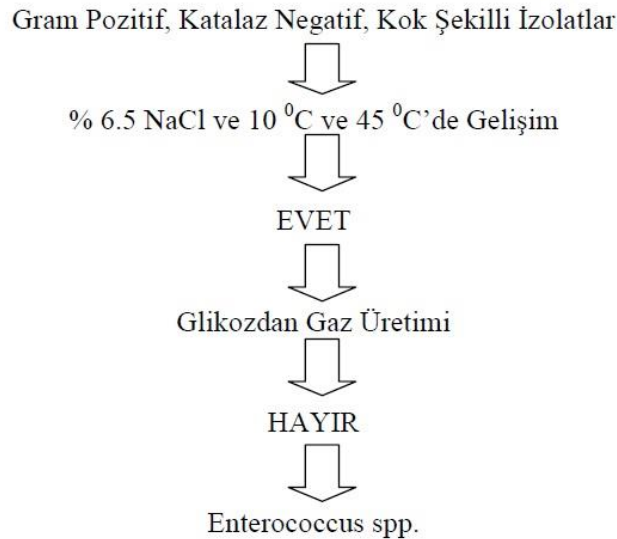
Kazein hidrolizat 17.5 g

Nişasta 1.5 g

pH 7.3 ± 0.1 (sterilizasyondan önce) ayarlandı. 38 gram toz besiyeri 1 L. saf su ile karıştırıldı ve 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi.

2.2.2. Enterokokların İzolasyon ve İdentifikasyonu

Örnekler kanlı agara ekilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen kolonilere gram boyama yapılarak Gram pozitif kok olanlara katalaz testi uygulandı. Katalaz testi negatif olanlar *Streptococcus* spp. olarak nitelendirilip enterokok tanımı yapılması için ‘safra esculin agar’ (Enterococcel Agar) ekildi. 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen siyah koloniler seçilerek ‘brain heart infusion agar’ besi yerine pasajları yapıldı. İzole edilen enterokok şüpheli izolatlar oksidaz testi, PYR testi, % 6.5’luk NaCl’de üreme testi uygulanarak *Enterococcus* spp. olarak cins düzeyinde tanımlandı (Şekil 3.1).



Şekil 2.1. *Enterococcus* spp.’nin tanımlanması (Klein, 2003)

2.2.2.1. Katalaz Testi

Kanlı agar besi yerinde üretilmiş 24 saatlik saf bakteri kültüründen 3-5 koloni öze ile lam üzerine konuldu. Lam üzerine bir damla % 3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) konuldu. Hava kabarcıkları oluşturmayan suşlar katalaz negatif olarak değerlendirildi ve gram pozitif, katalaz negatif kok olarak çalışmaya alındı (Winn ve ark 2006).

2.2.2.2. Oksidaz Testi

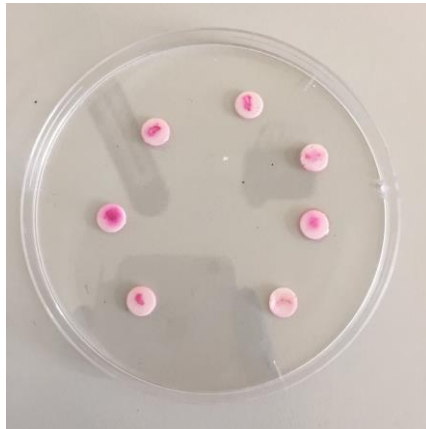
Kanlı agar besi yerinde üretilmiş 24 saatlik saf bakteri kültüründen öze yardımıyla test kiti (Bactident Oxidase, Merck) üzerine sürüldü. Mor renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.2.3 Safra Eskülin Testi

Bu test için bile-esculin-azid agar kullanıldı. Bu besiyerine kanlı agarda saf kültür olarak üreyen 24 saatlik bakteri kültüründen ekim yapıldı. Safra eskulin agarda 37 °C'de 24-48 saatlik inkubasyon sonrasında agarda üreyen ve eskülini parçalayarak siyah renk oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Winn ve ark 2006).

2.2.2.4. Pyrolidonyl Arylamidase (PYR) testi

Pyrolidonyl naphthylamid (Sigma) emdirilmiş kağıt tabaka üzerine 24 saatlik saf bakteri kültüründen bir-iki koloni konulduktan sonra bir damla PYR ayracı (% 0.015 pdimetylaminocinnamaldehyde) damlatılarak 2 dk. inkubasyona bırakıldı. Pembe renk veren suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Gordon ve ark.1987).



Şekil 2.2. PYR hidroliz testi

2.2.2.5. % 6.5 NaCl'de Üreme Testi

Kanlı agarda 24 saat üretilmiş koloniden öze ile % 6.5 NaCl (Merck) içeren brain heart infüzyon buyyonu içine ekilerek 35 °C'de 24–72 saat inkube edildi. Buyyonda üreme sonucu turbidite oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan 2002).

2.3. PCR Gereçleri

2.3.1. Solusyonlar

2.3.1.1. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base	121,1 g
Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklav edilip, pH 8.0 ayarlanarak buzdolabında saklanmıştır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE	50 ml
Distile su	950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanmıştır.

2.3.1.2. Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O	10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanmıştır.

2.3.1.3. Tris (1M)

Tris Base	121 g
-----------	-------

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7.6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 121 °C'de 15 dk otoklav edilmiştir.

2.3.1.4. NaCl (1M)

NaCl	58,44 g
Distile Su	800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

2.3.1.5. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M)	10 ml
EDTA(0,5 M)	2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlanmıştır.

2.3.1.6. MgCl₂, Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25 mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer 1 (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 10X Taq Buffer 2 ((NH₄)₂ SO₄ -MgCl₂) 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanılmıştır.

2.3.2. Primerler

Araştırılan genlerin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.1., Çizelge 2.2. ve Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. PCR amplifikasyonlarında kullanılan *ddl_{E. faecalis}* ve *ddl_{E. faecium}* primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları (Dutka-Malen ve ark 1995)

Primer Çifti	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Hedef Gen	Büyüklik (bp)
<i>ddl_{E. faecalis}</i>	F-ATCAAGTACAGTTAGTCTT R-ACGATTCAAAGCTAACTG	D-Ala Ligaz	941
<i>ddl_{E. faecium}</i>	F-GCAAGGCTTCTTAGAGA R-CATCGTGTAAGCTAACTC	D-Ala Ligaz	550

Çizelge 2.2. PCR amplifikasyonlarında kullanılan aph(2'')-Ia1, aph(2'')-Ib1, aph(2'')-Ic1 ve aph(2'')-Id1 primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları (Chow ve ark 1997)

Primer Çifti	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Büyüklik (bp)
aph(2'')-Ia1	F-GAGCAATAAGGGCATACCAAAAATC	369
	R-CCGTGCATTTGTCTTAAAAAACTGG	867
aph(2'')-Ib1	F-TATGGATCCATGGTAACTTGGACGCTGG	
	R-ATTAAGCTTCCTGCTAAAATATAAACATCTCTGT	
aph(2'')-Ic1	F-TGACTCAGTCCAGAT	444
	R-AGCACTGTTGACACAAA	
aph(2'')-Id1	F-GGTGGTTTTTACAGGAATGCCATC	641
	R-CCCTCTCATACCAATCCATATAACC	

Çizelge 2.3. PCR amplifikasyonlarında kullanılan esp11 ve esp 12 primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon boyutları (Vergis ve ark 2002)

Primer Çifti	Oligonükleotiddizisi (5'-3')	Büyüklik (bp)
Esp11	F-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	
Esp12	R-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933

2.3.3. Termal Döngüleme Cihazı

PCR amplifikasyonu 25 örnek kapasiteli Eppendorf® Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.3.4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Biorad marka elektroforez tankında, görüntüleme işlemi VilberLourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. Agaroz Jel

Agaroz (Sigma)	2 g
TBE (0,5X)	100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırılmış ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutulmuştur. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde

dökülmüş ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirilmiştir.

2.3.6. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas®) kullanılmıştır.

2.3.7. Etidium Bromür

Görüntüleme için elektroforez işleminden önce 5 µl etidium bromid %2'lik agaroz jel içerisine eklendi.

2.3.8. Pozitif Kontrol

Araştırmamızda izolasyon-identifikasyon ve PCR çalışmaları aşamalarında *E. faecalis* ATCC 29212 ve *E. faecium* ATCC 700221 suşları kullanılmıştır.

2.3.9. DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu amacıyla birçok mikroorganizmadan yüksek kaliteli genomik DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş genomik DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas) kullanılmıştır.

Fermentas® DNA Isolation Kit Prosedürü:

*200 µl bakteri süspansiyonu 400 µl lizis solusyonu ile süspansiyon edildi. 65°C'de 5 dk inkübe edildi.

*600 µl kloroform eklendikten sonra 10.000 rpm.de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.

*800 µl presipitasyon solusyonu pelet üzerine eklendikten sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika karıştırıldı.

*10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra DNA içeren pelet 1.2 M NaCl solusyonunda çözdürüldü.

*300 µl etanol ilave edildikten sonra 10 dk -20°C’de bekletildi. 10.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildikten sonra %70’lik etanol ile yıkandı. Daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü.

2.4. PCR Yöntemi

Araştırmamızda kullanılan mastermiks hazırlama oranları Çizelge 2.4., Çizelge 2.5. ve Çizelge 2.6.’da gösterilmiştir.

Çizelge.2.4. *ddl_{E. faecalis}* ve *ddl_{E. faecium}* primer çiftleri ile yapılan PCR için mastermiks hazırlanma oranları (Dutka-Malen ve ark 1995)

Reaktifler	Miktar (µl)
PCR Buffer 10X (+(NH ₂)SO ₄)	5 µl
Taq polymerase (5 U)	0,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer- <i>ddl_{E. faecalis}</i> (100 pmol)-F	1 µl
Primer- <i>ddl_{E. faecalis}</i> (100 pmol)-R	1 µl
Primer- <i>ddl_{E. faecium}</i> (100 pmol) -F	1 µl
Primer- <i>ddl_{E. faecium}</i> (100 pmol) -R	1 µl
Template DNA	10 µl
ddH ₂ O	24,5 µl
TOPLAM	50 µl

Çizelge.2.5. aph(2'')-Ia1, aph(2'')-Ib1, aph(2'')-Ic1 ve aph(2'')-Id1 primer çiftleri ile yapılan PCR için mastermiks hazırlanma oranları (Chow ve ark 1997)

Reaktifler	Miktar (µl)
PCR Buffer 10X (+KCl)	5 µl
Taq polymerase (5 U)	0,5 µl
MgCl₂ (25 mM)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer- Ia1-F (100 pmol)	1 µl
Primer- Ia1-R (100 pmol)	1 µl
Primer- Ib1 -F (100 pmol)	1 µl
Primer- Ib1 -R (100 pmol)	1 µl
Primer- Ic1-F (100 pmol)	1 µl
Primer- Ic1-R (100 pmol)	1 µl
Primer- Id1-F (100 pmol)	1 µl
Primer- Id1-R (100 pmol)	1 µl
Template DNA	10 µl
ddH₂O	20,5 µl
TOPLAM	50 µl

Çizelge.2.6. esp11 ve esp 12 primer primer çiftleri ile yapılan PCR için mastermiks hazırlanma oranları (Vergis ve ark 2002)

Reaktifler	Miktar (µl)
PCR Buffer 10X (+KCl)	5 µl
Taq polymerase (5 U)	0,5 µl
MgCl₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer-esp11 (100 pmol)	1 µl
Primer-esp12 (100 pmol)	1 µl
Template DNA	10 µl
ddH₂O	29,5 µl
TOPLAM	50 µl

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 µL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine hazırlanılan mastermiksden 40'ar µl ilave edilmiştir. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan her bir template DNA'dan ayrı ayrı olmak üzere 10'ar µl alınıp, ilgili tüplerin içlerine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlanmıştır. PCR analizlerinde kullanılan ısıl döngü ve süre diyagramları Çizelge 2.7., Çizelge 2.8. ve Çizelge 2.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge.2.7. *ddl_{E. faecalis}* ve *ddl_{E. faecium}* primer çiftleri ile yapılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Dutka-Malen ve ark 1995)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	2 dk
Denatürasyon	30	94°C	1 dk
Bağlanma		54°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	10 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

Çizelge.2.8. *aph(2'')-Ia1*, *aph(2'')-Ib1*, *aph(2'')-Ic1* ve *aph(2'')-Id1* primer çiftleri ile yapılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Chow ve ark 1997)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	20 sn
Denatürasyon	35	94°C	30 sn
Bağlanma		54°C	30 sn
Uzama		72°C	30 sn
Son Uzama	1	72°C	30 sn
Bekletme	1	4°C	∞ dk

Çizelge.2.9. esp11 ve esp 12 primer çiftleri ile yapılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı (Vergis ve ark 2002)

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	95°C	1 dk
Denatürasyon	30	94°C	45 sn
Bağlanma		63°C	30 sn
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	2 dk
Bekletme	1	4°C	∞ dk

2.4.1. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

PCR işlemi üzerine elde edilen ürünlerden 10' ar µl pipet yardımıyla alınıp, 3 µl 6x loading dye solusyonu ile karıştırılmıştır. Oluşturulan karışımın tamamı alınarak, % 2'lik agaroz jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklenmiştir.

2.4.2. Jelde Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra 80V 500A akımda 40 dakika yürütülmüştür.

2.4.3. Görüntüleme ve Değerlendirme

Elektroforez işleminin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkarılmıştır. Süre sonunda yürütülen jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirmiştir. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant büyüklükleri her PCR için ayrı olarak değerlendirilmiştir.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapılmıştır. PCR analizinde, biyokimyasal identifikasyon sonucu cins düzeyinde *Enterococcus* spp. olarak identifiye edilen suşların *E. faecalis* ve *E. faecium* tür bazında idntifikasyon ayrımında *E. faecalis* için 941 bp, *E. faecium* için 550 bp büyüklüğündeki bant oluşumları aranmıştır.

Aminoglikozid direnç geni varlığının saptanmasında aph(2'')-Ia için 369 bp, aph(2'')-Ib için 867 bp, aph(2'')-Ic için 444 bp ve aph(2'')-Id için 641 bp büyüklüğündeki bant oluşumları aranmıştır. Esp11 ve Esp12 için 933 bp büyüklüğündeki bant oluşumları aranmıştır.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

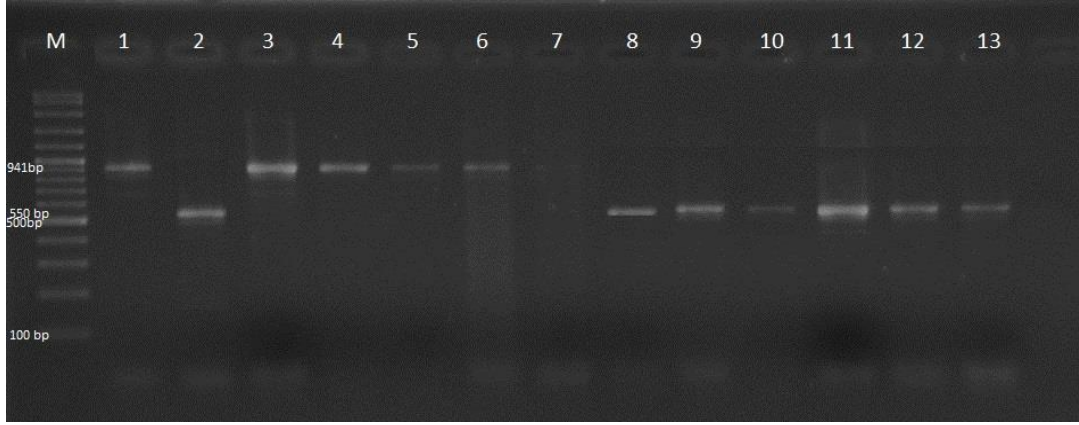
Araştırmamızda 130 adet kediden rektal svap numunesi toplanmış ve Enterokok türleri açısından identifikasyona tabi tutulmuştur. Örnekler kanlı agara ekilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra üreyen kolonilere gram boyama yapılmıştır. Gram pozitif kok olanlara katalaz testi uygulanmıştır. Katalaz testi negatif olanlar Enterococcel Agara ekilmiştir ve 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Enterococcel Agarda üreyen siyah koloniler seçilerek oksidaz testi, PYR testi, % 6.5’luk NaCl’de üreme testi uygulanmıştır. Bu biyokimyasal testler sonucunda 130 adet rektal svap numunesinden 64 (% 50) adet *Enterococcus* spp. izole ve identifiye edilmiştir.

3.2. PCR Bulguları

Araştırmamızda cins düzeyinde *Enterococcus* spp. olarak identifiye edilen suşların, ddI_{E. faecalis} ve ddI_{E. faecium} primer çiftleri ile yapılan PCR işlemi sonucunda 38 (% 59) adedi *E. faecalis*, 26 (% 41) adedi ise *E. faecium* olarak identifiye edilmiştir. Enterokokların tür bazında identifikasyon oranları Çizelge 3.1.’de gösterilmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarına ait elektroforez görüntüsü Şekil 3.1.’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Enterokokların tür bazında identifikasyon oranları

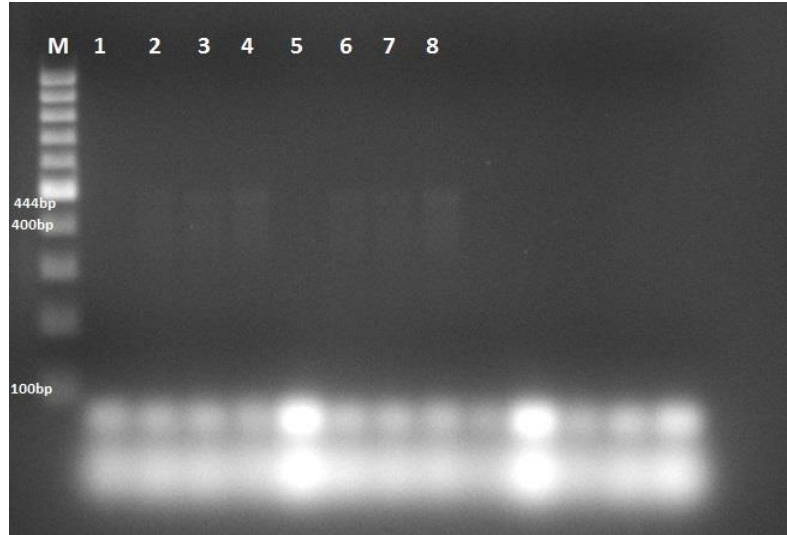
Suş (n:64)	İdentifikasyon Sayısı	İdentifikasyon Oranı
<i>E. faecalis</i>	38	59
<i>E. faecium</i>	26	41



Şekil 3.1. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarına ait elektroforez görüntüsü

M:100 bp DNA ladder, 1: *E. faecalis* ATCC 29212 pozitif kontrol, 2: *E. faecium* ATCC 700221 pozitif kontrol, 3-7: *E. faecalis* pozitif örnekler, 8-13: *E. faecium* pozitif örnekler

Araştırmamızda aph(2'')-Ia, aph(2'')-Ib, aph(2'')-Ic ve aph(2'')-Id primer çiftleri ile aminoglikozid direnç geni saptanmasına yönelik yapılan PCR çalışması sonucunda 38 adet *E. faecalis* suşunun 8 (% 21) adedinin aph(2'')-Ic geni açısından pozitif olduğu ve fosforilasyon enzimine sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen 26 adet *E. faecium* suşundan ise aminoglikozid direnç geni saptanmamıştır. Aminoglikozid direnç genlerine ait elektroforez görüntüsü Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Ayrıca araştırmamızda elde edilen 38 adet *E. faecalis* ve 26 adet *E. faecium* suşundan *Esp* direnç geni saptanmamıştır.



Şekil 3.2. Aminoglikozid direnç genlerine ait elektroforez görüntüsü

M:100 bp DNA ladder, 1: aph(2'')Ic1 gen bölgesi negatif örnek, 2-4: aph(2'')Ic1 gen bölgesi pozitif örnekler, 5 aph(2'')Ic1 gen bölgesi negatif örnek, 6-8: aph(2'')Ic1 gen bölgesi pozitif örnekler

4. TARTIŞMA

Enteroklar, insanlarda gastrointestinal kanalda yüksek düzeyde bulunmalarına karşın deri, oral kavite, alt solunum yolu ve ürogenital sistemlerde daha az sayıda normal flora etkeni konumdadırlar (Huycke ve ark., 1998). Düşük virulense sahip olmalarına rağmen konağın vücut direncinin kırılması ile birlikte fırsatçı patojen karakterleri ön plana çıkarak sıklıkla intraabdominal infeksiyon, idrar yolu infeksiyonları, menenjit, endokardit, deri ve yumuşak doku infeksiyonları gibi endojen ve ekzojen kaynaklı infeksiyonlarda primer veya sekonder olarak yer alabilmektedirler (Schouten ve ark 1999, Ustaçelebi ve ark 1999, Devriese ve ark 2006).

Enterokoklar, dış ortamlarda değişen sıcaklık, pH düzeylerinde ve hatta bazı bakterisidal etkili deterjanların varlığında dahi canlılığını koruyabilmektedir. Bakterinin özellikle nozokomiyal infeksiyonlardaki önemi de giderek artmakta, hatta bazı olgularda nozokomiyal bakteriyemilerden sorumlu tutulmaktadır (Lautenbach ve ark 1999, Patterson 2000).

Çeşitli ülkelerde nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında enterokokların ikinci sırada yer aldığı bildirilmektedir. En sık infeksiyon etkeni olan türlerden *E. faecalis* klinik örneklerden izole edilen enterokokların % 85-95'ini, *E. faecium* ise % 5-10'unu oluşturmaktadır (Teixeria ve ark 2003).

Özseven ve ark., (2011) idrar örneklerinden izole ettikleri 124 enterokok suşunun 60 (%48)'inin *E. faecalis* ve 61 (%49)'ünün de *E. faecium* olduğunu; Baylan ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada alınan idrar örneklerinden izole ettikleri toplam 91 enterokok izolatının 59 (%64.8)'unun *E. faecalis*, 31 (%34.1)'inin ise *E. faecium* olarak tanımlendiğini; Vural ve ark., (2014) ise idrar örneklerinden izole edilen 187 enterokok suşunun 103 (%55.1)'ünü *E. faecalis*, 74 (%39.5)'ünü de *E. faecium* olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Yazgı ve ark., (2003), inceledikleri 163 rektal svap örneğinden izole ettikleri 116 enterokok suşunun 67 (%57.7)'sini *E. faecalis*, 45 (%38.8)'ini de *E. faecium*, olarak tanımladıklarını; Kaçmaz ve ark., (2003) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 62

enterokok suşunun 20 (%74)'sini *E. faecalis* ve 5 (%19)'ini de *E. faecium* olarak belirlediklerini; Ergin ve ark., (2013) ise idrar örneklerinden izole ettikleri 47 enterokok kültürünün 21 (%44.7)'inden *E. faecalis* ve 18 (%38.3)'inden de *E. faecium* tespit etiklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, kedilerden alındıktan sonra incelenen 130 rektal svap örneğinden toplam 64 adet *Enterococcus* spp. izole ve identifiye edilmiştir. İzolatların multipleks PCR tekniği ile tür spesifik primerler kullanılarak yapılan identifikasyonlarında dışkı orijinli Enterokok suşlarının 38 (% 59) adedi *E. faecalis* olarak identifiye edilirken; izolatların 26 (% 41) adedi de *E. faecium* olarak saptanmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda (Kaçmaz ve ark 2003, Yazgı ve ark 2003, Baylan ve ark 2011, Özseven ve ark 2011, Ergin ve ark 2013, Vural ve ark 2014), *E. faecalis*'in izolasyon oranı %44-74, *E. faecium*'un izolasyon oranı ise %19-49 arasında değiştiği görülmektedir. Bu araştırmada incelenen enterokokların toplam izolasyon oranlarının diğer çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte nispeten yüksek olduğu gözlenmiştir. İzolasyon oranlarındaki fazlalığın, pet olarak kedi sahibi olan insanlar için risk teşkil ettiği ortaya konulmuştur.

Enterokokların önemli bir kısmı Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan birçok antimikrobik ajana karşı doğal dirençli oluşları ile dikkat çekmektedirler (Güçkan ve ark., 2013). Penisilinler, sefalosporinler, kinolonlar ve düşük düzeyde aminoglikozidler gibi çok sayıda antibiyotiğe doğal direnç göstermelerinin yanı sıra enterokokların yeni mekanizmalarla antibiyotik direnci oluşturduğu ve bu direnci plazmidler aracılığıyla aktarabildiği tespit edilmiştir (Moellering 2000).

Son zamanlarda Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde en çok kullanılan antimikrobiyel ajanlardan beta-laktamlar, aminoglikozidler, eritromisin, klindamisin ve trimetoprim/sulfametoksol dahil birçok antibiyotiğe dirençliliklerinde artış saptanmıştır. Beta-laktamlara olan kısmi dirençleri penisilin bağlayan proteinlerin bu ajanlara karşı düşük afinitesinden kaynaklanmaktadır. Aminoglikozid, makrolid ve linkozamidlerin hücre duvarından yeterince geçememeleri nedeniyle bu ajanlara karşı düşük düzeyde direnç gösterirler. *In vitro* olarak trimetoprim/sulfametoksol duyarlı

görünsele de eksojen folat kaynaklarını kullanma yeteneğinde olduklarından bu ajana da dirençlidirler (Ulusoy, 1999; Güçkan ve ark., 2013).

Yüksek düzeyde aminoglikozit direnci (AME); gentamisin, streptomisin ve kanamisin antibiyotiklerine yüksek düzeydeki direnci ifade eder. Enterokokların düşük düzeyde doğal olarak aminoglikozitlere dirençli olması tedavide sinerjistik etki oluşturmak amacıyla hücre duvarı sentezini inhibe eden bir antibiyotikle aminoglikozit grubu antibiyotiğin kombine kullanımını gerektirir. Ancak plazmid ve transpozonlar aracılığı ile kazanılmış direnç gelişimi nedeniyle yüksek düzey aminoglikozit direncinin ortaya çıkışı tedavide aminoglikozitler ile kombine olarak hücre duvarı sentezini inhibe eden ajanların kullanılması ile elde edilen sinerjistik etkiyi de ortadan kaldırmaktadır (Shepard ve ark 2002). Bu nedenle AME direncinin belirlenmesi önemlidir. Çalışmamızda aminoglikozid dirençlilik grubuna ait genlerin spesifik primerleriyle PCR yapılmıştır. PCR ürünlerinin dizi analizleri sonucunda çoğaltılan bölgelerin aminoglikozit direnç gen bölgeleri olduğu saptanmıştır. Aminoglikozid direncinden fosforilasyon enzimi kodlanması ile sorumlu aph(2'')Ic1 gen bölgesinin spesifik primerlerle gerçekleştirilen PCR sonucunda 444 bp uzunluğunda gen bölgesi çoğaltılmıştır.

Enterokoklarda bir veya daha fazla aminoglikozide yüksek düzeyli direnç, artan sıklıkta bildirilmektedir (Gordon ve ark 1992, Strausbaugh ve ark 2000). Baykan (2001), idrar örneklerinden izole ettiği enterokok suşlarında gentamisin direncini %52 oranında saptarken; Kart ve ark (2010) çocuk kliniği ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole ettikleri enterokok suşlarında gentamisin direncini %80; Özseven ve ark., (2011) çeşitli klinik örneklerden ürettikleri enterokok suşlarında %44; Kalaycı ve ark., (2011) ise idrar örneklerinden izole ettikleri enterokokların gentamisin direncini %51.2 olarak tespit etmişlerdir.

Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarının gentamisin direncine yönelik yapılan çalışmalarda, Berzeg (2005) izole edilen *E. faecalis* suşlarının %8'inin ve *E. faecium* suşlarının da %68'inin; Aral ve ark., (2011) *E. faecalis* suşlarının %16'sının ve *E. faecium* suşlarının da %60'ünün; Iraz ve ark., (2012) *E. faecalis* suşlarının %42'sinin ve *E. faecium* suşlarının da %69'unun; Altun ve ark., (2013) *E. faecalis* suşlarının %44'ünün ve *E. faecium* suşlarının da %71'inin; Güçkan ve ark., (2013) ise izole edilen *E. faecalis*

suşlarının %44'ünün ve *E. faecium* suşlarının da %40'ının gentamisin'e dirençli olduğunu bildirmektedirler.

Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının hiçbiri gentamisine dirençli olarak saptanmamıştır. Elde edilen bulguların, diğer çalışmalarda tespit edilen sonuçlardan düşük olduğu görülmektedir. Enteroklardaki gentamisin yüksek düzey direncinin sıklıkla bifonksiyonel enzimler sayesinde olduğu bildirilmiştir (Harada ve ark 2005). Elde ettiğimiz Enterokokal suşlarda bifonksiyonel enzim kodlayan genlere rastlanmamıştır. Bundan dolayı gentamisin direnci görülmediği sonucuna ulaşılmıştır.

5. SONUÇ

Araştırmamızda Aydın ve İzmir illerinde bulunan sahipli kedilerden alınmış olan 130 adet rektal svap numunesinden 38 adet *E. faecalis* ve 26 adet *E. faecium* olmak üzere toplam 64 adet enterokokal suş izole ve identifiye edilmiştir. Bu suşların, çoklu ilaç fenotipi gelişimini içeren determinantlar bakımından incelenmesi sonucu; kazanılan antibiyotik dirençliğine sebep olan aph(2'')Ic1 gen bölgelerine % 12.5 oranında sahip oldukları belirlenmiştir.

Enterokoklar virulensi düşük bakteriler olmalarına rağmen önemli nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak yerlerini korumaktadırlar. Birçok antibakteriyel ilaca karşı doğal veya kazanılmış dirence sahip olmalarından dolayı son yıllarda hastane infeksiyon etkenleri arasında hızla yükselmişlerdir. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı, dirençli bakteri suşlarının yararına bir seleksiyon oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, ülkemizden izole edilen klinik kökenli bakterilerde antibiyotiklere karşı direncin artışına işaret etmektedir. Özellikle 1980'lerden sonra antibiyotiklere karşı değişik tiplerde direnç mekanizmaları geliştiren ve infeksiyon tedavisinde mevcut antibiyotik kullanımını kısıtlayan enterokoklarda direncin genetiği araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Çoğul dirençli enterokokların dirençten geni taşıyan plazmidlerini streptokok ve stafilokoklara aktararak vankomisin ve penisilin dirençlilik özelliklerini bu bakterilere iletme yetenekleri, hem de bu infeksiyonların yayılma olasılığı oldukça fazla risk taşımaktadır. Bu nedenle infeksiyon risk faktörlerinin, hazırlayıcı etkenlerin, direnç saptama ve tarama yöntemleri ile korunma yollarının sistematik bir şekilde saptanması gerekmektedir.

Nozokomiyal infeksiyonlara neden olan bu bakterilerin Veteriner Hekimlik'te dikkatleri üzerine toplamamasının nedeni büyük olasılıkla, yoğun bakım ünitelerinin eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Öte yandan bu çalışma ile birlikte insanlarla yakın temas halinde bulunan kedilerin, Enterokok taşıyıcılığı bakımından risk teşkil ettiği, muayene ve rutin laboratuvar analizlerinde bu durumun da göz önüne alınması gerekliliği ortaya konmuştur. Enterokokların çoklu ilaç dirençlilikleri ile ilgili Veteriner Hekimlik'te daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

ÖZET

Kedilerden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* suşlarında esp Geni Varlığının Araştırılması

Bu çalışmada 130 kediden elde edilen rektal svap örneği, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarı'nda enterokok izolasyonuna tabi tutulmuştur. İzole edilen enterokok suşları tür bazında PCR ile tanımlenmiştir. İdentifikasyonları yapılan suşlarda çoklu ilaç direnç genleri ve enterokokal yüzey proteini (Esp) varlığı araştırılmıştır.

İzolasyon çalışmaları sonucunda 130 adet numuneden 38 (% 29) *Enterococcus faecalis* ve 26 (% 21) *Enterococcus faecium* olmak üzere toplam 64 (% 50) adet enterokok saptanmıştır. 8 (% 21) adet *E. faecalis* suşunda fosforilasyon enzimini kodlayan gen taşıyıcılığı saptanmış, suşların hiçbirinde esp geni taşıyıcılığı belirlenmemiştir.

Bu çalışma ile birlikte insanlarla yakın temas halinde bulunan kedilerin, enterokok taşıyıcılığı bakımından risk teşkil ettiği, muayene ve rutin laboratuvar analizlerinde bu durumun da göz önüne alınması gerekliliği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *E. faecalis*, *E. faecium*, identifikasyon, kedi, PCR, esp geni

SUMMARY

Investigation of *esp* Gene Presence From *Enterococcus faecalis* Strains Isolated From Cats

In this study, 130 rectal swab samples taken from cats were involved to enterococci isolation in Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Microbiology. The isolated enterococci were identified by species specific PCR . Multiple drug resistancy genes and enterococcal surface proteins (Esp) were investigated in identified strains.

The isolation studies revealed that out of 130 samples, 64 (50 %) enterococci were identified as being 38 (29 %) of them are *Enterococcus faecalis* and 26 (21 %) of them are *Enterococcus faecium*. A total of 8 (21 %) strains were detected as carrier of phosphorilation enzyme coding gene and none of teh isolates were detected as esp gene carrier.

By this research it is confirmed that, the cats which have close contact with humans, have the risk for exposing the carriage of enterococci, and it is cleared that this situation have to be estimated for examinations and routine laboratory analyses.

Keywords: *E. faecalis*, *E. faecium*, identification, cat, PCR, esp gene

KAYNAKLAR

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner–Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2000; (37):127–137.

Akçimen B. Hastane infeksiyonlarından izole edilen vankomisin dirençli enterokokların pulsed field jel elektroforez yöntemiyle genotip tayini. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye. 2010.

Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli Enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection)* 2009; 23 (4): 201-209,

Altun D, Erdem G, Çöplü N, Çağatay M. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının çeşitli yöntemlerle araştırılması. *ANKEM Derg.* 2013; 27, 3, 130-134.

Anonim Enterokoklar Genel Bilgi. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210011701.pdf>
Erişim Tarihi: 15.04.2015.

Aral M, Paköz NİE, Aral İ, Doğan S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci, *Türk Hij Der Biyol Derg.* 2011; 68, 2, 85-92.

Baykan M. İdrar örneklerinden izole edilen enterokokların *in vitro* antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Genel Tıp Derg.* 2001; 11, 3, 119-121.

Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Çitil BE, Turan D, Öngen B, Özyurt M, Açikel CH, Haznedaroğlu T. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virulens faktörleri arasındaki ilişki. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45, 3, 430-445.

Beachey EH, Dale JB, Simpson WA, Evans JD, Knox KW, Ofek I, Wicken AJ. Erythrocyte binding properties of streptococcal lipoteichoic acids. *Infect. Immun* 1979; 23:618-625.

Berzeg D. Çeşitli klinik materyallerden izole 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 İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2005.

Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect. Immun* 1991; 59:4614-4620.

Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J Bacteriol* 1964; 88:653-659.

Butaye P, Verleyen P, Devriese LA, Van Bree H, Haesebrouck F. Enterococcus faecalis infection after orthopedic surgery in a dog 2000; 69: 42-43.

Centers for Disease Control and Prevention's Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) special report. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 1995; 16:105-113.

Chou YY, Lin TY, Lin JC, Wang NC, Peng MY, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41:124-129.

Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD. A Novel Gentamicin Resistance Gene In *Enterococcus* Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 1997; 511–514.

Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107:526-545.

Çetinel A S. Yüksek lisans tezi. Süt dişi kanallarından enterococcus faecalis izolasyonu, kültürel ve moleküler yöntemlerle tanınması ve antibiyotik duyarlılık profillerinden saptanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye 2008.

Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin- resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 686-707.

Devriese LA, Hommez J, Wijfels R, Haesebrouck F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *Journal of Applied Bacteriology* 1991; (71): 46-50.

Devriese LA, Deherdt P, Uyttebroek E, Lepoudre C, Ducatelle R, Dom P, Haesebrouck F. Streptococcon-en enterococcon-infecties bij vogels. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 1994; 63: 109-111.

Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Hommez J, Haesebrouck F. Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996; p. 2285–2287.

Devriese L, Baele M, Butaye P. The genus enterococcus: taxonomy. *Prokaryotes.* 2006;4:163-174.

Di Rosa R, Cecchini R, Bertuccini L, Penni A, Ghenardi G, Dicuanzo G, Venditti M, Baldassari L. Clinical Significance of Slime Production in Enterococcus spp. *Clin. Microbiol. And Infect.* 2000; Vol 6, suppl 1:154.

Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in Enterococcus gallinarum and Enterococcus casseliflavus. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1675–1677.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR Journal of Clinical Microbiology. 1995; 24-27.

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol 2001; 67:1628-1635.

Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:39-42.

Ergin ÖY, Bayram ED, Uzun B, Güngör S, Demirdal T. İdrar kültürlerinden izole edilen *Enterococcus* türleri ve antibiyotik dirençleri. ANKEM Derg. 2013; 27, 4, 173-178.

Facklam RR, Teixeria LM. Enterococcus. In: Collier L, Bolows A, Sussman (eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections. Vol 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edvard Arnold, 9th edition. London 1998; 669-682.

Farrar ET, Washabau RJ, Saunders H. Hepatic abscesses in dogs:14 cases(1982-1994). Journal of American Veterinary Medical Association 1996; 208: 243-247

Foulquie Moreno MR. Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health./ nf. J. Food Microbiol 2006; 106: 1-24.

Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? Review. Int J Food Microbiol, 1999;47, 1-24.

Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. Review article. Int J Food Microbiol 2003; 88, 105-122.

Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, Thornsberg C, Jarvis WR, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. J Clin Microbiol. 1992; 30:2373-2378.

Güçkan R, Elmas A, Tilgel S, Yüksel G. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Int J Basic Clin Med. 2013; 1:74-77.

Gültekin, M. Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi 2004; 121-40.

Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. Nature 2002; 415: 84-87.

Hallgren D, Hanberger H, Hossain A, Nilsson M, Svenson E, Nilsson LE. Activity of Common and New Antimicrobial Agents Against Enterococci at Intensive Care Units in Sweden". Clin. Microbiol. And Infect. 2000; Vol 6, suppl 1:127.

Hancock LE, Gilmore MS. Pathogenicity of enterococci. In: Gram-Positive Pathogens, Fischetti VA (ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC 2000; pp. 251–258.

Harada T, Tsuji N, Otsuki K, Murase T. Detection of the esp gene in high-level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* strains from pet animals in Japan *Veterinary Microbiology*, 2005; 106: 139–143.

Henwood C, Livermore D, Johnson A, James D, Warner M. “Susceptibility of Gram Positive Cocci from 25 UK Hospitals to Linezolid and Other Antibiotics. *Clin. Microbiol. And Infect.* 2000; Vol 6, suppl 1:86.

Herman DJ, Gerding DN. Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1991; 35:1-4.

Hummell, DS, Winkelstein JA. Bacterial lipoteichoic acid sensitizes host cells for destruction by autologous complement. *J. Clin. Invest* 1986; 77:1533-1538.

Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg.* 2012; 26: 176-180.

İşleroğlu H, Yıldırım Z, Demirpençe Y, Yıldırım M. Enterokoklar: biyokimyasal ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. *Akademik Gıda* 2006; 6(3):16-26

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 1994; p. 462-478.

Jett BD, Jensen HG, Atkuri RV, Gilmore MS. Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:9-12.

Kaçmaz B, Akça G, Çağlar K, Sultan N. Enterokoklarda antimikrobiyel duyarlılık. *ANKEM Derg.* 2003; 17:28-32.

Kalaycı Ö, Yurtsever S, Güngör S, Uzun B, Kurultay N. İdrar örneklerinden izole edilen Enterokokların *In vitro* antibiyotiklere direnç oranlarının değerlendirilmesi. *Klinik Derg.* 2011; 24: 105-107.

Karagöz G. Uzmanlık Tezi. Yoğun Bakım Ünitesinde Vankomisin Dirençli Enterokok Taşıyıcılığının Araştırılması. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2005.

Kart KY, Pehlivanoglu F, Şimşek M, Şengöz G. Çocuk kliniği ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci. *Zeynep Kamil Tıp Bül.* 2010; 41: 143-147.

Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*. Relationship To Endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15:308-320.

Kawalec M, Kaminska T, Hryniewicz W. "Evaluations of Vitek GPS-514 Cards in Detection of Vankomisin and HLAR in Enterococci". Clin. Microbiol. And Infect. 2000; Vol 6, suppl 1:172.

Key LL Jr, Wolf WC, Gundberg CM, Ries WL. Superoxide and bone resorption. Bone 1994; 15:431-436.

Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium. International Journal of Food Microbiology 2003; 88: 269–290.

Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastrointestinal tract. Int. J. Food Microbiol 2003; 88: 123-131.

Korten V, Murray BE, Gillespie VE. Enterococci in Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 1st Ed. Chichester: John Wiley & Sons 1997: 93-108.

Lautenbach E, Bilker W, Brennan P. Enterococcal bacteremia: risk factor for vancomycin resistance and predictors of mortality. Infect Control Hosp Epidemiol. 2000; 20: 318-323.

Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, Embden JV, Willems RJL. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of enterococcus faecium and associated with epidemicity. Journal of Bacteriology. 2004; 186: 672-682.

Marothi YA, Agrihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance –An overview. Indian Journal of Medical Microbiology. 2005; 23:214-219.

Moellering JC. *Enterococcus* Species. In Mandell GL, et al. Principles and Practice of Infectious Diseases 5th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2000; 2147-2156.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13: 513–522.

Murray, B.E. The life and times of the Enterococcus. Clinical Microbiological Reviews 1990; 3: 46-65.

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect. Immun 2000; 68: 5218–5224.

Özmen Toğay S, Temiz A. Gıda kaynaklı enterokokların gıda ve insan sağlığı yönünden önemi. Gıda 2011; 36 (5):303-310.

Özseven AG, Sesli Çetin E, Cicioğlu Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Derg. 2011; 25: 256-262.

Paberza R, Majore A, Luzbinska L, Hromova S. "Invitro Resistance of Antibiotic Against Gram Positive Cocci in Latvia". Clin. Microbiol. And Infect. 2000; Vol 6, suppl 1:104.

- Patterson JE. New Gram positive agents in nosocomial infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2000; 13: 593-598.
- Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:1159-1163.
- Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. Enterococcus faecalis – the root canal survivor and ‘star’ in posttreatment disease. *Endodontic Topics* 2003; 6: 135–159.
- Rakita RM, Quan VC, Jacques-Palaz K, Singh KV, Arduino RC, Mee M, Murray BE, Specific antibody promotes opsonization and PMN-mediated killing of phagocytosis-resistant Enterococcus faecium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28: 291–299.
- Remedios AM, Wagner R, Caulkett NA, Duke T. Epidural abscess and discospondylitis in a dog after administration of a lumbosacral epidural analgesic. *Canadian Veterinary Journal* 1996; 37: 106-107.
- Schouten MA, Vose A, Hoogkamp-Karstanje JAA. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Ch.* 1999; 43: 2542-2546.
- Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycinresistant Enterococcus faecalis. *Nature* 2002; 417: 746– 750.
- Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection.* 2002; 4: 215–224.
- Stiles ME, Holzapfe WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol* 1997; 361:1 -29.
- Strausbaugh LJ, Gilmore MS Enterococcal Infections. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. *Streptococcal Infections: Clinical As-pects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis.* New York, NY: Oxford University Press, 2000; 280-301.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60:2622–2636.
- Teixeira LM, Facklam RR. Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology.* Eighth edition, Washington. ASM Press, Washington DC, 2003; 422-433.
- Tok NÇ. Enterokoklarda vankomisin direnci. Uzmanlık Tezi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye 2006.
- Trotter KM, Dunny GM. Mutants of Enterococcus faecalis deficient as recipients in mating with donors carrying pheromoneinducible plasmids. *Plasmid* 1990; 24:57-67.

Tsutsui, O, Kokeyuchi S, Matsumura T, Kato K. Relationship of the chemical structure and immunobiological activities of lipoteichoic acid from *Streptococcus faecalis* (*Enterococcus hirae*) ATCC 9790. *FEMS Microbiol. Immunol* 1991; 3:211-218.

Tunail N. Microflora of the Intestine/ Biology of the *Enterococcus* spp. in; *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson RK (chief ed), Academic Press, UK 1999; pp 1365-1373.

Ulusoy S. Dirençli Gram pozitif bakteri infeksiyonları. *Hast İnf Derg.* 1999; 3:212-221.

Unat EK. Gram pozitif koklar. *Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi*, 2. Baskı, Emek Matbaacılık 1986: 429-480.

Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umopathy BL. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2009; 27:301-305.

Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara. 1999; 81-108.

Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, Wagener MM, Muder RR. Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 35:570–5.

Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *ANKEM Derg* 1999; 13: 1-4.

Vural DG, Temiz H, Aktar GS, Onur A, Ayaydın Z, Turhanoglu M, Vural H. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları, 29.Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Bodrum, 28-31 Mayıs 2014, *ANKEM Derg*, 28: 1, 26.

Wegener HC. Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: the American- European paradox revisited. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:3049.

Wells CL, Moore EA, Hoag JA, Hirt H, Dunny GM, Erlandsen SL. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect. Immun*. 2000; 68: 7190–7194.

Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology*. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williamsa Wilkins. 6.baskı 2006; 40- 643.

Xu Y, Singh KV, Qin X, Murray BE, Weinstock GM. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect. Immun* 2000; 68: 815–823.

Yazgı H, Ertek M, Uslu H, Kadanalı A. Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci ile beta laktamaz üretimi ilişkisi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2003; 33: 333-336.

ÖZGEÇMİŞ

Andaç UZER GÜLEN 1983 yılında Ankara'da doğdu. İlköğrenimi Manisa Gazi İlköğretim Okulu'nda, orta ve lise öğrenimini İzmir Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2001 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi'nden 2006 yılında mezun oldu. Ekim 2010'da Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans programından mezun oldu. Şubat 2007 ile Mayıs 2010 tarihleri arasında İzmir Karşıyaka Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak görev yaptı. 2010 yılı Haziran ayından beri Antalya Büyükşehir Belediyesi Sağlık İşleri Dairesi Başkanlığı Veteriner İşleri Şube Müdürlüğü'nde, Veteriner Hekim olarak görevini sürdürmektedir. Evli ve yabancı dil olarak "İngilizce" bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarımda desteğini aldığım danıŐmanım Prof. Dr. Şükrü KIRKAN'a, çalıŐmalarım boyunca ilgilerini gördüğüm Prof. Dr. Osman KAYA'ya, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Yrd. Doç. Dr. Uğur PARIN'a ve hep yanımda olan aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.