

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ(VET) ANABİLİM DALI



**KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK TÜRLERİNDE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE VİRULANS GENLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yılmaz BOYAR

**Danışman**

Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ

**HATAY-2017**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ(VET) ANABİLİM DALI

**KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK TÜRLERİNDE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE VİRULANS GENLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yılmaz BOYAR

**Danışman**

Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 10863  
nolu proje olarak desteklenmiştir.

**HATAY-2017**

T.C.  
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ(VET) ANABİLİM DALI

**KÖPEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK TÜRLERİNDE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ VE VİRULANS GENLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

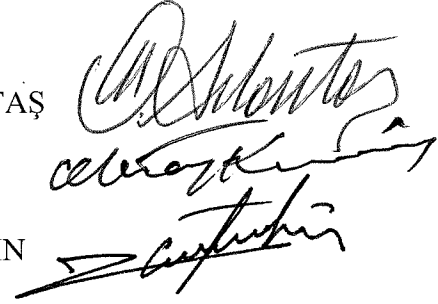
Yılmaz BOYAR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 20/07/2017 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:** Jüri Başkanı: Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ

Üye: Prof. Dr. Oktay KESKİN

Üye: Doç. Dr. Zafer CANTEKİN



Bu tez enstitümüz Mikrobiyoloji(Vet) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Fatih SAKİN  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü V.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana danışmanlık eden, tezimin her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen, çalışma süresince büyük bir sabırla bilgi ve tecrübesinden yararlanma imkanı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a göstermiş olduğu yardımlardan ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamasındaki çalışma süresince desteklerini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Zafer CANTEKİN'e, eğitim hayatım boyunca bana sağlamış olduğu destek ve imkanlar nedeni ile babam İbrahim BOYAR'a, hayatımın her anında, sonsuz güven ve desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem Nilüfer BOYAR ve kardeşlerime, bir an dahi bana olan inancını kaybetmeyen, hayat arkadaşım ve sevgili eşim Pelin YÜCESOY BOYAR'a, tez yazım aşaması boyunca, uykusuz zamanlarımda beni yalnız bırakmayan çocuklarım, Deniz BOYAR ve Derin BOYAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET .....	X
ABSTRACT .....	XI
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Temel Bilgiler.....	2
2.2. Enterokoklarda Direnç Mekanizmaları.....	3
2.2.1. İntrinsik Direnç.....	3
2.2.2. Kazanılmış Direnç.....	3
2.2.2.1. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin Direnci.....	4
2.2.2.2. Tetrasiklin Direnci.....	4
2.2.2.3. Glikopeptid Direnci.....	5
2.2.2.3.1. Düşük seviyede glikopeptid direnci.....	5
2.2.2.3.2. Yüksek seviyede glikopeptid direnci.....	5
2.2.2.3.2.1. Yüksek seviyede vankomisin direncinin mekanizması.....	6
2.2.2.4. Glikopeptid Direnç Fenotipleri.....	6
2.2.2.4.1. VanA fenotipi.....	6
2.2.2.4.2. VanB fenotipi.....	7
2.2.2.4.3. VanC fenotipi.....	8
2.2.2.4.4. Van D fenotipi .....	8
2.2.2.4.5. VanE fenotipi.....	8
2.2.2.4.6. VanG fenotipi.....	9
2.2.2.5. Aminoglikozid Direnci.....	9
2.2.2.5.1. Streptomisin ve gentamisine yüksek seviyede direnç.....	9
2.2.2.6. Ampisiline Direnç Mekanizması.....	11

2.2.2.7. Kinolon Direnç Mekanizması.....	11
2.3. Virulens Genleri.....	12
2.3.1. Kolonizasyonda rol oynayan virulens faktörleri.....	12
2.3.1.1. Agregasyon Faktörü (AF).....	12
2.3.1.2. Enterokokal yüzey proteini (Esp).....	12
2.3.1.3. Endokarditis spesifik antijen (EfaA).....	13
2.3.2. Dokuları etkileyen virulens faktörleri.....	13
2.3.2.1. Sitolizin (Cyl).....	13
2.3.2.2. Jelatinaz (GelE).....	13
2.3.2.3. Hyaluronidaz (Hyl).....	14
2.3.2.4. Seks feromenleri.....	14
2.4. Enterokokların Neden Olduğu Hastalıklar.....	14
2.4.1. İnsanlarda Enterokokların Neden Olduğu Hastalıklar.....	14
2.4.2. Hayvanlarda Enterokokların Neden Olduğu Hastalıklar.....	14
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>16</b>
3.1. Gereç.....	16
3.1.1. Rektal Sıvab Örnekleri .....	16
3.1.2. Referans Suşlar.....	16
3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar.....	16
3.1.4. Gram Boyama Seti.....	16
3.1.5. Antibiyotik Diskleri.....	16
3.1.6. Ayıraç ve Solusyonlar .....	17
3.1.6.1. %3'lük Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	17
3.1.6.2. 10× TBE Buffer (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0).....	17
3.1.6.3. Gel Loading Dye.....	17
3.1.6.4. Marker.....	17
3.1.6.5. Safe Dye.....	17
3.1.6.6. MgCl <sub>2</sub> , Taq DNA Polimeraz, 10× Taq Buffer, dNTP Set.....	17
3.1.6.7. Primerler.....	17
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. <i>Enterococcus</i> spp. İzolasyonu.....	20
3.2.2. <i>Enterococcus</i> spp. İzolatların İdentifikasyonu.....	20

3.2.3. <i>Enterococcus</i> spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	20
3.2.4. DNA İzolasyonu.....	20
3.2.5. Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi .....	20
3.2.6. Virulens Genlerinin Belirlenmesi .....	21
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>22</b>
4.1. İzolasyon ve identifikasyon sonuçları.....	22
4.2. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	22
4.3. Antimikrobiyal direnç genleri.....	22
4.4. Virulens genlerinin prevalansı.....	24
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>30</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>31</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>36</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 2.1.</b> Enterokok suşlarında belirlenen tetrasiklin ve makrolid direnç genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	23
<b>Şekil 2.2.</b> Kloramfenikol dirençli enterokok suşlarında belirlenen <i>cat</i> direnç geninin ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	24
<b>Şekil 2.3.</b> Virulens genlerinin agaroz jel görüntüsü.....	24
<b>Şekil 2.4.</b> Enterokok izolatlarında virulens genlerinin dağılımı.....	25





## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Çizelge 1.1.</b> Enterokokların sınıflandırılması.....	3
<b>Çizelge 2.1.</b> Antimikrobilyallere dirençli enterokok izolatlarında direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	18
<b>Çizelge 2.2.</b> Enterokok izolatlarında virulens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	19
<b>Çizelge 2.3.</b> Enterokok türlerinde belirlenen direnç fenotipleri.....	23



## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AF</b>	Agregasyon faktörü
<b>BHIA</b>	Brain Heart Infusion Agar
<b>bp</b>	Baz çifti
<b>CLSI</b>	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
<b>Cyl</b>	Sitolizin
<b>dATP</b>	Deoksiadenin trifosfat
<b>dCTP</b>	Deoksisitozin trifosfat
<b>dGTP</b>	Deoksiguanin trifosfat
<b>dTTP</b>	Deoksitimin trifosfat
<b>dNTP</b>	Deoksinükleotid trifosfat
<b>EfaA</b>	Endokarditis spesifik antijen
<b>erm</b>	Eritromisin ribozom metilaz
<b>Esp</b>	Enterokokal yüzey proteini
<b>GeE</b>	Jelatinaz
<b>Hyl</b>	Hyaluronidaz
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klorür
<b>MİK</b>	Minimal inhibitör konsantrasyon
<b>MLS<sub>B</sub></b>	Makrolid, linkozamid ve streptogramin B
<b>MR-KNS</b>	Metisilin dirençli koagulaz negatif stafilokok
<b>MRSA</b>	Metisilin dirençli Staphylococcus aureus
<b>NB</b>	Nutrient Broth
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PBP-5</b>	Pensilin bağlayan protein-5
<b>QRDR</b>	Kinolon direncini belirleyen bölge
<b>TBE Buffer</b>	Tris, Borik Asit, EDTA
<b>VRE</b>	Vankomisin dirençli enterokok

## ÖZET

### **Köpeklerden İzole Edilen Enterokok Türlerinde Antimikrobiyal Direnç ve Virülans Genlerinin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal dirençli enterokokların hayvanlardan insanlara geçtiği ve nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen nedenleri arasında yer aldıkları bilinmektedir. Bu nedenle, farklı hayvan türlerinde antimikrobiyal direncin sürekli olarak izlenmesi hem hayvan hem de insan sağlığı için önemlidir. Bu çalışmada, köpeklerden alınan 125 rektal sıvab örneğinden izole edilen 107 enterokok suşunun antimikrobiyal direnç profilleri, dirence aracılık eden mekanizmalar ve virülans özelliklerinin araştırılması amaçlandı. En yüksek direnç oranı tetrasikline (%65.4) karşı belirlenirken, siprofloksasin (%19.6), eritromisin (%19.6), kloramfenikol (%8.4) ve ampisiline (%3.7) ise değişen oranlarda direnç belirlendi. Onüç (%12.1) enterokok suşunda çoğul direnç fenotipi (MDR) görüldü. Tetrasiklin dirençli izolatlarda *tetM* geni ağırlıklı olarak saptandı. Eritromisin dirençli 22 izolatın 18'inin *ermB* geni taşıdığı tespit edildi. İzolatlar arasında *ccf* (%54.2), *efaA<sub>fs</sub>* (%52.3), *cpd* (%45.8) ve *jelE* (%44.9) virülans genleri sıklıkla belirlendi. Bu sonuçlar köpeklerden izole edilen enterokok suşlarında yüksek düzeyde antimikrobiyal direncin ve virülans genlerinin mevcut olduğunu ve potansiyel bir halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, *Enterococcus* spp., antimikrobiyal direnç, virülans genleri

## ABSTRACT

### Determination of Antimicrobial Resistance and Virulence Characteristics in *Enterococcus* Isolates from Dogs

Antimicrobial resistant enterococci are among the leading causes of nosocomial infections. Transmission of antimicrobial-resistant enterococci from animals to humans has been reported. For this reason, continuous monitoring of antimicrobial resistance in different animal species is of importance both for animal and human health. In this study, it was aimed to investigate the antimicrobial resistance profiles, resistance mechanisms implicated and virulence traits of 107 enterococci isolated from 125 rectal swab samples taken from dogs. The highest resistance rate was determined against tetracycline (65.4%), followed by ciprofloxacin (19.6%), erythromycin (19.6%), chloramphenicol (8.4%) and ampicillin (3.7%). Thirteen (12.1%) enterococci showed multidrug resistance (MDR). The *tetM* gene was predominantly detected among tetracycline isolates. Of 22 erythromycin resistant isolates, 18 harbored the *ermB* gene. The frequently detected virulence gene was *ccf* (54.2%), *efaA<sub>fs</sub>* (52.3%), *cpd* (45.8%) and *gelE* (44.9%). These results indicate that high level of antimicrobial resistance and virulence genes exists among enterococci from dogs and poses a potential public health concern.

**Key words:** Dog, *Enterococcus* spp., antimicrobial resistance, virulence genes

# 1.GİRİŞ

Antimikrobiyallere dirençli bakterilerin neden oldukları infeksiyonların yüksek tedavi giderleri, yüksek morbitide ve mortalite oranları sebebiyle dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmiştir. Sindirim sistemi florasının bir parçası olan enterokok türleri de direnç genlerini kazanabilmeleri yanında, kazandıkları direnç genlerini gastrointestinal kanalda bulunan diğer kommensal bakterilere ve patojen bakterilere horizontal olarak transfer edebilmektedir. Bu durum enterokokların antimikrobiyal direnç determinantları için bir rezervuar olarak klinik önemini artırmaktadır. Köpeklerdeki infeksiyonların tedavisinde insanlarda kullanılan antimikrobiyallerin kullanılması, bu tür antimikrobiyallere karşı direnç genlerinin seleksiyonunu neden olmaktadır. Ayrıca, köpeklerin sahipleri ile aynı ortamı paylaşmaları ve yakın temasta olmaları dirençli bakterilerin karşılıklı olarak transferini büyük oranda kolaylaştırmaktadır (Guardabassi ve ark. 2004).

Enterokokların nozokomiyal patojenler olarak önemi sahip oldukları intrinsik direnç ve geniş antimikrobiyal direnç kazanma kapasiteleri nedeniyle 1980'li yılların başından itibaren önemli olarak artmıştır (Arias ve Murray 2012). *Enterococcus faecalis* 1980'li yılların başında enterokokal infeksiyonların %90'ından sorumlu tutulurken (Murray 1990), takip eden yıllarda *Enterococcus faecium* infeksiyonları *E. faecalis* infeksiyonlarına oranla artmış ve kısmen de nozokomiyal infeksiyonların nedeni olarak *E. faecalis*'in yerini almıştır (Hidron ve ark. 2008, Top ve ark. 2007, Treitman ve ark. 2005). *E. faecium*'un kolaylıkla diğer antimikrobiyallere direnç kazanabilmesi enterokokal infeksiyonlarındaki artışın nedeni olarak gösterilmiştir (Leclercq ve ark. 1992). Özellikle, *E. faecium* suşlarında önce ampisilin (Galloway-Pena ve ark. 2009) ve 1986 yılında ise transfer edilebilir yüksek seviyede vankomisin direncinin ortaya çıkışı ciddi endişelere neden olmuştur (Leclercq ve ark. 1988, Uttley ve ark. 1988). En sık karşılaşılan nozokimyasal infeksiyonlar arasında enterokok kaynaklı olanlar Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'inde üçüncü sırada ve Avrupa'da ise dördüncü sırada gelmektedir (Hidronve ark. 2008).

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Temel Bilgiler

Yirminci yüzyılın başlarında *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* aynı türler olarak kabul edilmiş, fakat 1940'lı ve 1950'li yıllarda yapılan çalışmalar bu iki etkenin farklı biyokimyasal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Deibel 1964). 1980'lere kadar *Enterococcus* genusuna ait türler *Streptococcus* olarak klasifiye edilmiştir. 1984 yılında yapılan DNA homoloji çalışmaları *S. faecalis* ve *S. faecium*'un streptokoklardan oldukça farklı olduğunu göstermiş ve bu iki tür *Enterococcus* genusuna aktararak sırasıyla *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* olarak adlandırılmıştır (Schleifer ve Kilpper-Bälz 1984). Takip eden yıllarda çok sayıda enterokok türü izole edilmiştir (Kohler 2007). Günümüzde National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank'da Taxonomy browser'a kayıtlı 54 *Enterococcus* türü bulunmaktadır (Erişim tarihi: 15.06.2017, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=enterococcus>).

Enterokoklar insan ve hayvanların bağırsak florasında kommensal olarak bulunmaktadır (Sghir ve ark. 2000). Ayrıca, Enterokoklar toprak, bitki ve su gibi çevresel kaynaklarda kolaylıkla tespit edilebilmesi (Moore ve ark. 2008) yanında; gıda fermentasyonunda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Knudtson ve Hartman 1993, Gelsomino ve ark. 2001, Parker ve ark. 1998).

Enterokoklar Firmicutes filumuna aittir ve Enterococcaceae familyasında yer almaktadır. Enterokokların sınıflandırılması Çizelge 1.1'de verilmiştir. Enterokoklar Gram pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif ve safra varlığında eskülini hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Enterokoklar ekstrem koşullarda örneğin hem 10°C hem de 45°C'de, %6.5 NaCl varlığında ve pH:9.6'da üreyebilirler. İlave olarak 60°C'de 30 dk canlılığını koruyabilirler (Facklam ve ark. 1989). Enterokoklarda G+C oranı düşüktür (%36-40) (Lam ve ark. 2012). *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin genom dizi analizleri yapılmış ve bu iki bakterinin genomlarının çok sayıdaki insersiyon sekansları (IS) ve diğer hareketli genetik elementlerin varlığı nedeniyle rekombinasyon yeteneklerinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Galloway-Pena ve ark. 2012).

**Çizelge 1. 1.** Enterokokların sınıflandırılması

<b>Kingdom</b>	<b>Bacteria</b>
Division	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Enterococcaceae
Genus	<i>Enterococcus</i>

## **2.2. Enterokoklarda Direnç Mekanizmaları**

Enterokokların temel özelliklerinden birisi de antimikrobiyallere karşı gösterdikleri yüksek direnç oranlarıdır. Bu durum aynı zamanda enterokok infeksiyonlarında görülen yüksek mortalite oranlarının nedenlerinden birisi olarak gösterilmektedir. Çok farklı sınıftan antimikrobiyale intrinsik ve/veya kazanılmış dirence sahip enterokokların neden oldukları infeksiyonların tedavisi güç olmakta, daha uzun sürmekte ve hastanede kalış süresinin uzamasına neden olmaktadır (Yıldız 2014). Enterokoklar (i) intrinsik olarak çok sayıda antimikrobiyale dirençli olabildikleri gibi ve diğer sınıftan antimikrobiyallere de mutasyonlar ve horizontal gen transferi ile de (ii) kazanılmış direnç gösterebilmektedir (Aktaş ve Derbentli 2009).

### **2.2.1. İntrinsik direnç**

İntrinsik direnç enterokok türlerinde kromozomal direnci ifade eder. Enterokok türlerinde penisilin, sefalosporin, trimetoprim-sulfametaksazol, düşük düzeyde aminoglikozid, polimiksin, monobaktam ve kinopristin/dalfopristin direnci bu tarzdaki dirence örnek olarak verilebilir (Yıldız 2014).

### **2.2.2. Kazanılmış direnç**

Kazanılmış direnç mutasyonlar veya plazmid, transpozon gibi hareketli genetik elementlerin kazanılması (konjugasyon, transdüksiyon, transformasyon) sonucu meydana gelmektedir. Beta-laktam, aminoglikozid, kloramfenikol, tetrasiklin, kinolon, makrolid, linkozamid, streptogramin B ve glikopeptit direnci bu tür direnç kapsamında ortaya çıkmaktadır (Yıldız 2014).

### 2.2.2.1. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin Direnci

Makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) kimyasal yapıları farklı, fakat etki mekanizmaları aynı olan antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklere karşı (i) hedef modifikasyonu, (ii) aktif efluks ve (iii) enzimatik inaktivasyon gibi farklı kazanılmış direnç mekanizmaları tanımlanmıştır. Hedef modifikasyonu *erm* (eritromisin ribozom metilaz) genleri tarafından kodlanan metilazlar aracılığı ile 23 rRNA'daki bir adenin rezidüsünün metilasyonu sonucu şekillenen konformasyonel değişikliklere bağlı olarak şekillenir ve makrolidlerin bağlanmasına mani olur. Bu gen yapısal MLS<sub>B</sub> direnç fenotipine neden olur ve 14- (klaritromisin ve eritromisin) ve 15- (azitromisin) üyeli makrolidler tarafından indüklenir (Leclercq ve Courvalin 1991). *erm* geninin varlığı MLS<sub>B</sub> antibiyotiklere yüksek seviyede (MİK ≥128 mg/l) dirence neden olur (Zhong ve ark. 1999). Enterokoklarda MLS<sub>B</sub> antibiyotiklere direnç sıklıkla *ermB* geni aracılığı ile gerçekleşmektedir. Metilazlar sıklıkla transpozonlar (*ermA Tn554* ve *ermB Tn551*) veya büyüklükleri 2.4-5 kb arasında değişen küçük plazmidler (*ermC*) üzerinde yer almaktadır (Aarestrup ve ark. 2000). Makrolidlere karşı diğer bir direnç mekanizması MsrA ve MefA gibi iki farklı sınıfa ait aktif efluks pompaları aracılığı ile gerçekleşmektedir (Roberts ve ark. 1999).

### 2.2.2.2. Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklinler geniş spektrumlu, etkili ve nisbeten ucuz olması nedeniyle veteriner ve insan hekimliğinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Tetrasiklinlere karşı kazanılmış direnç; (i) ribozomal koruma, (ii) bakteri hücrelerinden antibiyotiğin dışarı atılması ve (iii) antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu gibi üç temel mekanizma ile gerçekleşir (Chopra ve Roberts 2001). Bugüne kadar kanatlı enterokok izolatlarında *tetL*, *tetM*, *tetO* ve *tetU* genleri tespit edilmiştir. *tetS* geni sadece et, domuz eti ve insan kaynaklı enterokoklarda belirlenirken (Aarestrup ve ark. 2000), *tetK* insan kaynaklı bir *E. faecalis* suşunda gösterilmiştir (Roberts ve Hillier 1990). *tetM* geni genellikle kromozomal olarak lokalize olmuştur ve hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterileri de içeren geniş bir konakçı spektrumuna sahip *Tn916/Tn1545* familyasına ait konjugatif transpozonlar üzerinde taşınmaktadır (Chopra ve Roberts 2001). *Tn916* benzeri transpozonlar sadece *tetM* genini taşıırken, *Tn1545* benzeri transpozonlar *tetM* ile birlikte *ermB* genini de taşımaktadır (Rice 1998). *Tn916/Tn1545* familyasına ait transpozonların



integraz geni domuz ve insan kaynaklı enterokoklarda belirlenmiştir (De Leener ve ark. 2004).

### **2.2.2.3. Glikopeptid Direnci**

Enterokoklarda glikopeptidlere hem yüksek hem de düşük seviyede direnç ortaya görülebilmektedir.

#### **2.2.2.3.1. Düşük seviyede glikopeptid direnci**

*Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus casseliflavus* türlerinde görülen, intrinsik olarak düşük seviyede vankomisin (MİK : 8-16 µg/ml) direncine neden olan, indüklenmeyen ve transfer edilemeyen bir dirençtir. Bu fenotipe sahip türler teikoplanine duyarlıdır. Bu türler vankomisinin 32 µg/ml konsantrasyonunda genellikle inhibe olurlar (Reynolds 1989). Bu tür dirence Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında yer alan peptidlerin terminal D-alanil-D-alanin prekürsörü yerine D-alanil-D-serin girmesine neden D-alanil:D-serin ligaz enzimi neden olur. Bu enzimin sentezinden sorumlu olan *vanC* geni kromozomal bir lokalizasyona sahiptir (Reynolds ve ark. 1999, Arias ve ark. 1999, Arias ve ark. 2000). Hem *E. gallinarum* hem de *E. casseliflavus*'da (*vanC-1* ve *vanC-2*) bulunan D-alanil:D-serin ligaz genleri bu türler için spesifiktir ve bu iki türün birbirinden ve diğer enterokok türlerinden ayırt edilmesinde kullanılabilir (Leclercq ve ark. 1992, Navarro ve ark. 1994). *E. flavescens* hemen hemen *vanC-2* ile identik bir gene sahip üçüncü bir tür olarak kabul edilmektedir ve *E. casseliflavus* ile aynı türler olarak da kabul edilmektedir (Navarro ve ark. 1994).

Enterokoklar tarafından kazanılan bazı *van* gen kümeleri de D-serin ile sonlanan peptidoglikan prekürsörleri sentezleyerek de vankomisine düşük seviyede direncin ortaya çıkmış neden olabilir. Bunlar özellikle *vanE*, *vanG*, *vanL* ve *vanN* genleri içerirler (Fines ve ark. 1999, Lebreton ve ark. 2011).

#### **2.2.2.3.2. Yüksek seviyede glikopeptid direnci**

Enterokoklarda yüksek seviyede vankomisin direnci önemli bir sorundur. Çünkü sıklıkla ampisiline yüksek dirençli izolatlarda (esas olarak *E. faecium*) görülmektedir. Enterokokların antibiyotik direncini kazanma eğilimi hakkındaki farkındalığa rağmen, 1980'li yılların sonuna kadar vankomisin direncinin ortaya çıkışı beklenmiyordu. Bu

şaşkınlık otuz yıldır ticari olarak kullanımda olan vankomisine karşı yüksek seviyede direncin görülmemiş olması gerçeğinden kaynaklanmaktaydı. Bununla birlikte ABD'nde 1980'li yılların başlarında metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), metisilin dirençli koagulaz negatif stafilokoklar (MR-KNS) ve *Clostridium difficile* dikkat çeken önemli patojenler olarak ortaya çıkmış ve 1970'li yılların sonuna kadar da vankomisin klinik alanda önemli oranda kullanılmamıştır (Guardabassi ve Agersø 2006).

#### **2.2.2.3.2.1. Yüksek seviyede vankomisin direncinin mekanizması**

Vankomisin; hücre duvarı prekürsörlerinin D-alanil-D-alanin (D-Ala-D-Ala) ucuna bağlanarak hücre duvarı sentezinde rol oynayan enzimatik basamakları olumsuz yönde etkileyerek enterokokların üremesine mani olur. Yüksek seviyedeki vankomisin direnci farklı gen kümeleri tarafından (Örn: *vanA*, *B*, *D* ve *M* gen kümesi) kodlanmaktadır. D-Ala-D-Ala ile sonlanan peptidoglikan prekürsörünün D-alanil-D-laktat ile yer değiştirmesi vankomisinin önemli düzeyde düşük affinite ile bağlanması ile sonuçlanır (Reynolds 1989). D-alanin yerine D-laktat geçmesi hedefi ile vankomisinin etkileşimi için gerekli 5 hidrojen bağından birini bloke eder ve antibiyotiğin MİK değerini yaklaşık 1000 kat artırır.

#### **2.2.2.4. Glikopeptid Direnç Fenotipleri**

Enterokoklarda glikopeptidler için tanımlanmış 6 direnç fenotipi mevcuttur

##### **2.2.2.4.1. VanA fenotipi:**

*vanA* tip direnç en yaygın olan fenotiptir ve genellikle diğer tiplere oranla daha yüksek dirence aracılık eder ve teikoplanine de çapraz dirence neden olur. *vanA* gen kümesi tipik olarak *Tn1546* üzerinde yer alır ve dirençle ilişkili transpozonlar bir plazmide lokalize olmuştur (Arthur ve Courvalin 1993). *vanA* kümesi MRSA klinik izolatları dahil diğer bakteri türlerine de dağılmıştır. Çok sayıdaki vankomisin dirençli *S. aureus* izolatu farklı ülkelerde rapor edilmiştir (vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus*-VISA ve vankomisin dirençli *S. aureus*-VRSA). Bu bulgular vankomisin direnç gen kümesinin tür bariyerini aştığını ve diğer bakteri türlerine yayıldığını ve tedavi seçeneklerin daha da kısıtladığı gerçeğini göstermektedir.

VanA fenotipini kodlayan genler (*vanS*, *R*, *H*, *A*, *X*, *Y*, *Z*) ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Arthur ve Courvalin 1993, Leclercq ve Courvalin 1997). *vanS* ve *vanR* genleri direncin ekspresyonunu indüklenmesine katılan iki komponentli regülatör bir

sistemi kodlamaktadır. *vanS* muhtemelen vankomisinin neden olduğu hücre duvarındaki değişikliği algılamakta ve direncin ortaya çıkması için gerekli üç genin (*vanA*, *vanH*, ve *vanX*) ekspresyonu için yanıt regülatörü olan *vanR*'ye sinyal göndermektedir.

VanH peptidoglikan sentezi için önemli miktarlarda D-laktat üreten bir dehidrojenazdır. VanA (*vanA* geni tarafından kodlanır) D-alanin'nin D-laktat'a bağlanmasını katalize eden bir ligazdır. Bu durum D-alanil-D-laktat formasyonu ile son bulur. Diğer tiplerde *vanA*'ya karşılık gelen ligazlar ise VanB, VanD, VanF ve VanM'dir. Bu komponent endojen enterokokkal enzimler tarafından tripeptide hücre duvarı prekürsörüne ilave edilir. Sonuç olarak D-Ala-D-Lak ile sonlanan pentapeptid bir prekürsör sentezlenir.

D-Ala-D-Lak içeren prekürsörün formasyonu eğer bakteri D-Ala-D-Ala ile sonlanan normal hücre duvarı prekürsörü üretmeye devam ediyorsa vankomisine direnç için yeterli değildir. VanX ve VanY direnç profilini tamamlar. VanX ise D-Ala-D-Ala'yı bölen bir D,D-dipeptidazdır (Reynolds ve ark. 1994). Bu peptidazın aktivitesinden kaçan ve peptidoglikan prekürsörleri ile birleşen herhangi D-Ala-D-Ala dipeptidi VanY tarafından uzaklaştırılır. VanY hücre duvarı prekürsöründen terminal D-ala'yı ayıran bir D,D-karboksipeptidazdır. Bu durum hücre duvarı sentezi için kullanılabilir fakat vankomisinin bağlanamayacağı bir tetrapeptid prekürsör oluşumuna neden olur (Reynold, 1989). Klonlandığında konak bakterinin teikoplanine karşı dirençli hale gelmesine neden olduğu bilinmesine rağmen *vanZ* geninin kodladığı proteinin fonksiyonu bilinmemektedir (Arthur ve ark. 1995).

#### **2.2.2.4.2. VanB fenotipi**

Bu fenotip ikinci en yaygın fenotiptir ve *vanA* ile kıyaslandığında daha az sıklıkla rastlanmaktadır. Bu fenotipe sahip bazı enterokoklar tarama sırasında vankomisin konsantrasyonu çok yüksek tutulacak olursa (>20 µg/ml) gözden kaçabilir. *vanA* ve *vanB* sentezleyen major fenotipik farklılık *vanB* kümesindeki genlerin ekspresyonu için teikoplaninin iyi bir indükleyici olmamasıdır. Bunun bir sonucu olarak *vanB* taşıyan bakteriler genellikle teikoplanine duyarlıdır. Bununla birlikte, *vanB* kümesi içindeki mutasyonlar teikoplanin dirençli izolatların ortaya çıkması ile sonuçlanabilir.

*vanB* gen kümesindeki genlerin büyük bir kısmı *vanA* kümesindeki genlere homologdur ve D-Ala-D-Lak ile sonlanan hücre duvarı prekürsörü üretecek şekilde fonksiyon görmektedir. Bununla birlikte, *vanB* gen kümesi *vanW* gibi tipik bir gene sahipken *vanZ* geninden yoksundur ve *vanY* geni de farklı lokalizasyona sahiptir. Bu fenotip orijinal olarak transfer edilemez olarak rapor edilmesine rağmen, *vanB* gen kümesinin kromozomal olarak lokalize olmuş büyük hareketli genetik elementler (90 - 250 kb) veya plazmidlerin bir parçası olarak transfer edilebildiğine dair çok sayıda bildirim bulunmaktadır. *vanB* kümesi *Streptococcus gallolyticus* (Mevius ve ark. 1998) ve anaerobik (*Eggerthella lenta* ve *Clostridium inoculum*) bakterilerde de gözlenmiştir (Stinear ve ark. 2001). *vanA* gen kümesi taşıyan bazı *E. faecium* izolatlarının *vanB* fenotipi eksprese ettiği Güneybatı Asya'da tanımlanmıştır (Gu ve ark. 2009). Bu izolatlar genellikle *vanY*, *vanX*, *vanZ* veya *vanR* genlerinde insersiyonlar veya delesyonlar taşımaktadır.

#### **2.2.2.4.3. VanC fenotipi**

Bu fenotip vankomisine düşük düzeyde dirence neden olmaktadır. *E. gallinarum* (*vanC1*), *E. casseliflavus* (*vanC2*) ve *E. flavescens* (*vanC3*) türlerinde görülen, yapısal olarak indüklenmeyen ve transfer edilemeyen bir dirençtir ve orta düzeyde MİK (2-32 µg/ml) değerine sahiptir. *vanC* tipi dirence sahip suşlar teikoplanine duyarlıdır (Çöleri ve Çökmüş 2008).

#### **2.2.2.4.4. Van D fenotipi**

Sadece *E. faecium* suşlarında bildirilmiştir. Bu fenotipe sahip enterokoklar vankomisin (MİK 64-128 µg/ml) ve teikoplanine (4-64 µg/ml) dirençlidir. *vanD* geni kromozomal lokalizasyona sahiptir ve transfer edilemez (Çöleri ve Çökmüş 2008).

#### **2.2.2.4.5. VanE fenotipi**

Sadece *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır. Bu fenotipe sahip izolatlar vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK 16 µg/ml), teikoplanine ise duyarlıdır ve transfer edilemez (Çöleri ve Çökmüş 2008).

#### **2.2.2.4.6. VanG fenotipi**

İlk olarak *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır. Bu fenotipe sahip izolatlar Vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK 12-16 µg/ml), teikoplanine ise duyarlıdır (Çöleri ve Çökmüş 2008).

#### **2.2.2.5. Aminoglikozid Direnci**

Enterokoklar intrinsik olarak düşük seviyeden orta seviyeye kadar değişen oranlarda aminoglikozid direnci gösterirler. MİK değerleri gentamisin için genellikle 8 - 64 µg/ml, streptomisin için ise 64 - 512 µg/ml arasında değişmektedir. Bununla birlikte bu iki antibiyotik hücre duvarı üzerine etkili olan penisilin veya vankomisin gibi ajanlarla kombine edildiğinde genel olarak sinerjizm görülmektedir. Bu sinerjetik etki, 1950'li yıllardaki enterokokkal endokarditis tedavisinde penisilin-streptomisin kombinasyonunun penisilin tek başına yaptığı etkiden daha fazla olduğu yönündeki klinik gözlemi açıklamaktadır. Bu uygulama sonraki yıllarda standart uygulama haline gelmiştir (Geraci ve Martin 1954).

Aminoglikozidlerin tüm enterokoklar için alışılmış yüksek MİK değerlerine ilave olarak; *E. faecium* suşlarında tobramisin için doğal olarak ortaya çıkan karakteristik yüksek MİK değerleri (64-1000 µg/ml) tür spesifik olarak kabul edilmektedir. Bu direnç 6'-asetil transferaz (*aac(6')-Ib*) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu enzim tobramisini modifiye ederken gentamisini modifiye etmez (Costa ve ark. 1993). Bu enzim hücre duvarı sentezi üzerinde etki eden antibiyotikler (penisilin) ile aminoglikozidler arasındaki sinerjizmi elimine eder. Benzer şekilde kanamisin dirence neden olan *aph(3')-IIIa* enzimine sahip enterokoklarda amikasinin sinerjetik etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle, küçük istisnalar hariç, gentamisin ve streptomisin enterokokkal infeksiyonların tedavisinde sinerjetik etkiyi sağlamak için kullanılacak iki aminoglikoziddir (Costa ve ark. 1993).

#### **2.2.2.5.1. Streptomisin ve gentamisine yüksek seviyede direnç**

Bu iki aminoglikozid antibiyotiğe yüksek seviyede direnç enterokokların kazanılmış dirençlerinin en ciddi olanlarından biridir. Bu antibiyotiklere yüksek seviyede direncin önemi, hücre duvarı sentezi üzerine etkili olan penisilin veya vankomisin ile gentamisin veya streptomisin arasındaki beklenen sinerjizmi ortadan kaldırmasıdır. Bu konuyla ilgili olarak 1959 yılında açıklanan çarpıcı bir raporda endokarditisli bir hastadan

penisilin–streptomisin kombinasyonu ile öldürülemeyen bir enterokok izolasyonu bildirilmiştir. Hasta o dönemde piyasada olan diğer bir aminoglikozid olan neomisin penisilin ile kombine edilerek tedavi edilmiştir. Çok sayıda enterokok izolatının 1970 yılına kadar streptomisin ve kanamisine kazanılmış yüksek düzeyde dirence sahip olduğu görülmüştür (Havard ve ark. 1959).

Streptomisin direnci ya yüksek düzeyde dirence (MİK >64 µg/ml) neden olan ribozomal mutasyon ya da genellikle düşük düzeyde dirence neden olan (MİK 4 – 16 µg/ml) streptomisin modifiye eden enzim (adeniltransferaz) sentezinin kazanılması ile şekillenmektedir (Eliopoulos ve ark. 1984).

Gentamisin, streptomisin ve kanamisine yüksek düzeyde dirençli bakterilere karşı etkili olduğu bulunmuş ve 1970’li yılların ortasına kadar enterokokkal endokarditis vakalarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte, 1979 yılından itibaren, gentamisine yüksek seviyede dirence sahip enterokoklar artan oranda rapor edilmiştir. Bu direnç sıklıkla iki fonksiyonel ilmeğe sahip enzimin üretimi sonucu şekillenmektedir. Bu domainlerden biri 2"-fosfotransferaz aktivitesine ve diğeri de 6'-asetiltransferaz aktivitesine sahiptir. Bu kombine enzimatik aktivite yüksek seviyede dirence ve/veya streptomisin hariç ticari olarak piyasada olan tüm aminoglikozidlere sinerjetik dirence neden olur. Bu çift fonksiyonel enzimi kodlayan *aph(2'')-Ia/aac(6')-Ie* geni daha önce stafilokoklarda bulunan gene identiktir (Courvalin ve ark. 1980).

Gentamisin ve streptomisine yüksek seviyede ortak direnç 1983 yılında ilk defa enterokok suşlarında rapor edilmiştir. Bu etkenler üzerine herhangi bir aminoglikozidin ampisilin veya vankomisin ile kombinasyonunun ampisilin tek başına kullanılmasına göre daha etkili olmadığı bildirilmiştir (Mederski-Samoraj ve Murray 1983).

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) enterokoklarda hem gentamisin hem de streptomisine yüksek seviyede direncin izlenmesini tavsiye etmektedir (CLSI 2012). Bu izleme streptomisinin 2000 µg/ml ve gentamisinin 500 µg/ml konsantrasyonunu içeren Brain Heart Infusion Agar (BHI)’da üremeleri test edilerek yapılmaktadır. BHI broth kullanıldığında ise streptomisinin 1000 µl/ml konsantrasyonunun kullanılması önerilmektedir. Alternatif olarak, direncin araştırılması Mueller Hinton Agar’da gentamisinin 120 µg (=500 µg/ml) ve streptomisinin 300 µg (=1000 µg/ml) konsantrasyonundaki diskleri kullanılarak da yapılmaktadır. Disk difüzyon testinin sonuçları kesin olmadığından, yüksek seviyede direnç diğer metodlarla doğrulanmalıdır.

Gentamisin ve streptomisine yüksek seviyede direncin belirlenmesi herhangi bir klinik durumda mevcut aminoglikozidlerin kullanımını devre dışı bırakmaktadır.

*aacA-aphD* geni yüksek düzeyde gentamisin direncine sahip enterokok izolatlarının çoğunluğunda plazmid üzerine lokalize olmuştur. *aacA-aphD* genini taşıyan determinantların yapısal çeşitliliği tespit edilmiştir (Leelaporn ve ark. 2008).

#### **2.2.2.6. Ampisiline Direnç Mekanizması**

Enterokoklarda penisilinaz üretimine dayanmayan yüksek seviyede ampisilin direnci önemli bir problemdir. Çünkü bu direnç beta-laktamaz inhibitörlerinin ilavesi ile bertaraf edilemez. Bu fenotip esas olarak *E. faecium* izolatlarında 1980'lerin ortasından itibaren görülmeye başlanmıştır. *E. faecium*, *E. faecalis*'e göre ampisiline daha fazla dirençli olmasına rağmen ampisilinin 8-32 µg/ml konsantrasyonunda inhibe olurken, son yıllarda nozokomiyal izolatlar arasında ampisilinin 256 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarına dahi yüksek seviyede direnç gözlenmeye başlamıştır (Grayson ve ark. 1991). Enterokoklarda ampisiline yüksek seviyede direnç aşağıdaki mekanizmalardan bir veya ikisini içermektedir: (i) PBP-5R'nin ekspresyonu, PBP-5 proteininin aktif bölgesindeki değişiklikler ve (ii) PBP-5 ekspresyonunda artış ve hücre duvarı sentezi için beta-laktamlara duyarlı olmayan transpeptidaz kullanımı (Mainardi ve ark. 2000, Mainardi ve ark. 2002). *E. faecium* suşlarında yüksek ampisilin direnci özellikle hücre duvarı sentezinde önemli rol oynayan pensilin bağlayan protein-5 (PBP-5) enzimidaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. PBP-5R ampisiline karşı yüksek MİK değerine sahip hastane kaynaklı *E. faecium* izolatları için karakteristiktir ve ampisiline daha düşük MİK değerleri gösteren toplumsal kaynaklı veya klinik olmayan suşların PBP5-S'inden genetik olarak %5 kadar farklılık göstermektedir (Fontana ve ark. 1996, Galloway-Peña ve ark. 2011).

#### **2.2.2.7. Kinolon Direnç Mekanizması**

DNA giraz enziminin kinolon direncini belirleyen bölgesindeki (QRDR) ve DNA topoizomeraz IV enzimini kodlayan *parC* genindeki mutasyonlar, efluks sistemi, antimikrobiyal modifiye eden direnç enzimleri ve plazmid aracılı mekanizmalar enterokoklarda fluorokinolonlara dirence neden olmaktadır (Jacoby 2005, Tankovic ve ark. 1996).

### **2.3. Virulens Genleri**

Enterokokların sahip olduğu virulens faktörleri bu etkenlerin patojenitelerini artırmaktadır. Bu virulens faktörleri konak dokulara kolonizasyona, invazyona, epitel hücreleri aracılığı ile translokasyona ve konak immun sistemden kaçmaya imkan sağlayarak, enfeksiyona neden olan suşların patojenitesini artırır. İlave olarak, virulent suşlar ya direkt olarak toksin sentezi ya da indirekt olarak inflamasyona neden olarak da konakta patolojik değişiklikler oluştururlar. Enterokokların virulens faktörleri (i) konak hücrelerine kolonizasyonu etkileyen yüzey faktörleri ve (ii) dokulara zarar veren ve enterokoklar tarafından salgılananlar olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilir (Chajekka-Wierzchowska ve ark. 2017).

#### **2.3.1. Kolonizasyonda rol oynayan virulens faktörleri**

##### **2.3.1.1. Agregasyon Faktörü (AF):**

AF tanımlanan ilk enterokokal yüzey proteindir. AF, plazmid üzerinde yer alan *asal* geni tarafından kodlanan ve 137 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir (Chajekka-Wierzchowska ve ark. 2017). AF, enterokok hücreleri arasında konjugasyon ile plazmid transferini kolaylaştırma ve konak hedef hücrelere adezyon gibi özellikler ile virulense katkı sağlamaktadır (Azimi Mahalleh ve Göncüoğlu 2014). Enterokoklar enfeksiyona ve bakteriyemi oluşturmak için intestinal veya ürogenital sistem epiteline penetre olmak, lenfatik ve vasküler sisteme girmek zorundadır. Bu translokasyonun kolaylaştırılmasında da AF rol oynamaktadır (Rozdzinski ve ark. 2001). AF, renal tübüler ve endokardiyal hücrelere bakteriyel aderansı ve intestinal hücreler tarafından hücre içine alınımı artırır (Galli ve ark. 1990). Ayrıca, deneysel hayvan endokarditis modelinde valvular vejetasyonu artırdığı gösterilmiştir (Chow ve ark. 1993).

##### **2.3.1.2. Enterokokal yüzey proteini (Esp):**

Esp, 200 kDa moleküler ağırlığı ile identifiye edilen en büyük enterokokal proteindir. Bu proteini kodlayan gen kromozomal olarak lokalize olmuştur. Esp, enterokoklar arasında genetik materyal aktarılmasında ve antibiyotiklere direnci artmasında önemli rol oynayan biyofilmin formasyonuna katıldığı gösterilmiştir (Chajekka-Wierzchowska ve ark. 2017). Bu sayede Esp konak dokulara enterokokların



kolonizasyonuna ve persiste olmasına katkıda bulunmaktadır. Yukarıda belirtilen rollerine ilave olarak, Esp enterokokların konak immün yanıtından kaçmasında da bir fonksiyona sahiptir. Esp geninin insidensinin *E. faecalis* ve *E. faecium* klinik suşları arasında sağlıklı bireylerden izole edilen suşlara oranla daha yüksek seviyede olduğu gösterilmiş ve patojenitedeki rolünün göstergesi olarak kabul edilmiştir (Dicuonzo ve ark. 2001).

### **2.3.1.3. Endokarditis spesifik antijen (EfaA):**

İlk olarak insanlarda endokarditise neden olan *E. faecalis* izolatlarında tanımlanmıştır (Azimi Mahalleh ve ark. 2014). Endokarditis spesifik antijen *E. faecalis* suşlarında *efaA<sub>fs</sub>* ve *E. faecium* suşlarında ise *efaA<sub>fm</sub>* genleri tarafından kodlanan yaklaşık 34 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir. *efaA* geni magnezyum iyonları tarafından regüle edilen ABC transporteri (permeaz) kodlayan *afaCBA* operonunun bir parçasıdır. EfaA proteini streptokokların hücre duvarında mevcut adezinlere homolog yapıdadır (ChajECKA-WierZchowska ve ark. 2017).

## **2.3.2. Dokuları etkileyen virulens faktörleri**

### **2.3.2.1. Sitolizin (Cyl):**

Sitolizin en iyi karakterize edilen enterokokal virulens faktörlerinden biridir. Gram negatif bakterilere karşı bakterisidal; eritrosit, lökosit ve makrofajlara karşı ise toksik etki gösteren bakteriyosin tip bir ekzotoksindir (ChajECKA-WierZchowska ve ark. 2017). Cyl sentezi sayesinde enterokoklar konak immün yanıtından kaçabilmektedir (Franz ve ark. 2001). Cyl sentezinden sekiz gen (*cylR1*, *cylR2*, *cylL1*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *cylI*) içeren bir operon sorumludur (ChajECKA-WierZchowska ve ark. 2017).

### **2.3.2.2. Jelatinaz (GelE):**

Jelatinaz yaklaşık 30 kDa moleküler ağırlığında ekstraselüler çinko bağımlı bir metallopeptidazdır. Enzim jelatin, elastin, kollagen, hemoglobin ve feromonlere bağı proteinler gibi diğer bioaktif peptidleri hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Kromozomal lokalizasyona sahip *gelE* geni tarafından kodlanmaktadır (ChajECKA-WierZchowska ve ark. 2017). Bu genin ekspresyonu bakteriyi saran fibrin tabakasının parçalanmasına neden olur ve etkenin daha ileri seviyede yayılmasına izin verir. İlave olarak GelE doğal immün

sistemin bir parçası olan antimikrobiyal peptidlerin yıkımlanmasından da sorumludur (Schmidtchen ve ark. 2002).

#### **2.3.2.3. Hyaluronidaz (Hyl):**

Hyaluronidaz yaklaşık 45 kDa moleküler ağırlığında ve *hyl* geni tarafından kodlanan bir proteindir. Enzim konnektif dokunun ve kıkırdağın mukopolisakkaritlerini yıkımlamada ve bakterilerin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. *hyl* geni klinik *E. faecium* izolatlarında yaygın olarak bulunurken, klinik *E. faecalis* izolatlarında ise çok nadiren görülmektedir (Chajicka-Wierzchowska ve ark. 2017, Rice ve ark. 2003).

#### **2.3.2.4. Seks feromenleri:**

Enterokoklar kromozomal olarak kodlanan ve plazmid akümülyasyonuna neden olan seks feromenlerine (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*) sahiptir. Seks feromenleri hücreler arasında plazmidlerin konjugatif transferini sağlayan 7-8 amino asit büyüklüğünde küçük moleküllerdir.

## **2.4. Enterokokların Neden Olduğu Hastalıklar**

### **2.4.1. İnsanlarda Enterokokların Neden Olduğu Hastalıklar**

Enterokoklar nozokomiyal ve toplumsal kaynaklı infeksiyonlara neden olabilmektedir. Sahip oldukları virulans faktörlerinin yardımı ile enterokoklar kalp kapakçıklarına ve böbrek epitel hücrelerine adezyon yeteneğine sahiptirler. Enterokokların üriner sistem infeksiyonlarına, endokardite, bakteriyemiye, karın içi ve pelvik infeksiyonlara, yara ve yumusak doku infeksiyonlarına, menenjite ve pediatrik infeksiyonlara neden oldukları bildirilmiştir (Yıldırım 2007).

### **2.4.2. Hayvanlarda Enterokokların Neden Olduğu Hastalıklar**

Enterokoklar farklı hayvan türlerinde sporadik infeksiyonlara neden olmaktadır. Kahverengi yumurtacı tavuklarda amiloid artropati ve sığırlarda subklinik mastitise neden olmaktadır (Akan 2006).

Bu tez çalışmasında, Hatay ilinde veteriner kliniklerine getirilen köpeklerden izole edilen olan enterokok türlerinin antimikrobilyallere olan direnç paternlerinin, dirence aracılık eden genetik mekanizmalarının ve virulens genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Rektal Sıvab Örneklerinin Toplanması

Örnekler Ocak 2014 - Haziran 2014 tarihleri arasında Hatay ilinde özel veteriner kliniklerine farklı amaçlarla getirilen (aşılama, tedavi vb) 125 köpekten alındı.

##### 3.1.2. Referans Suşlar

Çalışmada *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium* BM4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* BM 4174 (*vanC1*), *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC2*), *S. pyogenes* BM137 (*tetM*, *ermB*), *S. pyogenes* UR1092 (*ermA*) ve *S. aureus* R-16794 (*tetK*) pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

##### 3.1.3. Besiyerleri ve Kimyasallar

*Enterococcus* spp. izolasyonu amacıyla BBL Enterococcosel™ Broth (Becton Dickinson, L007453), Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) agar (Oxoid, CM0985), suşların pasajlanmasında Blood Agar Base (Merck, 110886), izolatların antimikrobiyallere olan duyarlılıklarının belirlenmesinde Mueller Hinton Agar (Merck, 105437), izolatların tuz toleranslarını belirlemek için %6.5 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Merck, 105443), izolatların saklanması için %20 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck, 110493) ve vankomisin dirençli izolatların selektif izolasyonu için Vancomycin Supplement (Oxoid, SR0186) kullanıldı.

##### 3.1.4. Gram Boyama Seti (Salubris, MB16-0088)

İzolatların boyanmasında kullanıldı.

##### 3.1.5. Antibiyotik Diskleri

İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla rifampin (5 µg), ampisilin (10 µg), vankomisin (30 µg), eritromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), teikoplanin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), kloramfenikol (30 µg) ve gentamisin (120 µg) diskleri kullanıldı.

### **3.1.6. Ayıraç ve Solusyonlar**

#### **3.1.6.1. %3'lük Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck)**

İzolatların katalaz aktivitelerini belirlemek için kullanıldı.

#### **3.1.6.2. 10× TBE Buffer (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8.0 Buffer) (Vivantis)**

Ticari olarak temin edildi.

#### **3.1.6.3. Gel Loading Buffer (6×) (Fermentas)**

PZR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde kullanıldı.

#### **3.1.6.4. 100 bp Plus Marker (Fermentas)**

PZR ürünlerinin büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanıldı.

#### **3.1.6.5. Safe Dye™ (Nucleic Acid Staining Solution, 21141)**

Agaroz jelin boyanması amacıyla 5 µl/100 ml oranında eklenerek kullanıldı.

#### **3.1.6.6. MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA Polimeraz, 10× Taq Buffer, dNTP Set**

Moleküler analizlerde 25 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimeraz (5U), 10× Taq Buffer (100 mM Tris-HCl, pH:8.3, 500 mM KCl), 10 mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanıldı.

#### **3.1.6.7. Primerler**

Antimikrobiyallere dirençli enterokok izolatlarında direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler Çizelge 2.1.'de, virulens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler ise Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Antimikrobiyallere dirençli enterokok izolatlarında direnç genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer Adı	Sekans (5'→3')		Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>erm(A)</i>	CCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT	CCCTGTTTACCCATTTATAAACG	590	Malhotra-Kumar ve ark. 2005
<i>erm(B)</i>	TGGATTCCAAATGCGTAATG	CTGTGGTATGGCGGGAAT	745	
<i>mef(A/E)</i>	CAATATGGGCAGGGCAAG	AAGCTGTTCCAATGCTACGG	317	
<i>tet(K)</i>	GATCAATTGTAGCTTTAGGTGAAGG	TTTTGTTGATTTACCAGGTACCATT	155	
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG	CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406	
<i>tet(O)</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC	TCCCCTGTTCCATATCGTCA	515	
<i>tet(L)</i>	TGGTGGAAATGATAGCCCAT	CAGGAATGACAGCACGCTAA	229	
<i>CatpIP 501-159</i>	GGATATGAAATTTATCCCTC	CAATCATCTACCCTATGAAT	505	Aerestrup ve ark. 2000
<i>aac(6)-Ie-aph(2)-Ia</i>	CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG	CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC	369	Vakulenko ve ark. 2003
<i>aph(2)-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC	GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	
<i>aph(2)-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC	CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	
<i>aph(2)-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC	CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	
<i>aph(3)-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG	CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523	
<i>ant(4)-Ia</i>	CAAACCTGCTAAATCGGTAGAAGCC	GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	
<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC	GTACAATGCGGCCGTTA	732	Depardieu ve ark. 2004
<i>vanB</i>	ACGGAATGGGAAGCCGA	TGCACCCGATTTTCGTTC	647	
<i>vanC1/2</i>	ATGGATTGGTAYTKGTAT	TAGCGGGAGTGMICYMGTA	815/827	
<i>vanD</i>	TGTGGGATGCGATATTCAA	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	500	
<i>vanE</i>	TGTGGTATCGGAGCTGCAG	ATAGTTTAGCTGGTAAC	430	
<i>vanG</i>	CGGCATCCGCTGTTTTTGA	GAACGATAGACCAATGCCTT	941	

**Çizelge 2.2.** Enterokok izolatlarında virulens genlerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

<b>Primer Adı</b>	<b>Sekans (5' - 3')</b>	<b>Ürün Büyüklüğü (bp)</b>	<b>Kaynak</b>
<i>gelE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	
<i>cylA</i>	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	
<i>ccf</i>	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAAT CGGTA AAAAT	543	
<i>efaA<sub>fs</sub></i>	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA	705	
<i>efaA<sub>fm</sub></i>	AACAGATCCGCATGAATA CATTCATCATCTGATAGTA	735	Eaton ve Gasson (2001)
<i>cylM</i>	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742	
<i>cpd</i>	TGGTGGGTTATTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	782	
<i>cylB</i>	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	843	
<i>esp</i>	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	Shankar ve ark. (1999)
<i>eep</i>	GAG CGG GTATTTTAGTTCGT TAC TCC AGCATTGGATGCT	937	Marques ve Suzart (2004)
<i>cob</i>	AACATTCAGCAAACAAAGC TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1,405	Eaton ve Gasson (2001)
<i>aggA</i>	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	

### **3.2.Yöntem**

#### **3.2.1. *Enterococcus* spp. İzolasyonu**

Rektal svab örnekleri Enterococcosel™ Broth içinde 37 °C'de 24 saat ön zenginleştirme işlemine tabii tutuldu. Süre sonunda renk değişikliği görülen eskülin pozitif tüplerden vankomisinli ve vankomisin içermeyen VRE agara ekimler yapılarak 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Süre sonunda eskülin pozitif kolonilerden biri seçilerek kanlı agara pasajlandı. Katalaz negatif, Gram pozitif ve %6.5 tuz içeren NB'da üreme özelliğine sahip izolatlar *Enterococcus* spp. olarak kabul edildi ve tür düzeyinde identifikasyonları yapılanaya kadar %20 gliserinli BHIB içinde -20 °C'de saklandı.

#### **3.2.2. *Enterococcus* spp. İzolatların İdentifikasyonu**

İzole edilen suşların tür düzeyinde identifikasyonları DNA dizi analizi ile yapıldı. Bu amaçla 16S rRNA geni universal primerler S16S20 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3') ve 16S1390 (5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') kullanılarak PZR ile çoğaltıldı ve ürünler %1'lik jelde görüntülendi (Sghir ve ark. 2000; Suau ve ark. 1999). Elde edilen ampliconların sekans analizi ticari olarak (Medsantek, İstanbul) yaptırıldı. Elde edilen sekanslar NCBI'nin web sayfasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) daha önce yayınlanmış sekanslar ile Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldı. %97 ve üzeri benzerlik tür düzeyinde identifikasyon için kriter kabul edildi.

#### **3.2.3. *Enterococcus* spp. İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi**

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları CLSI (2012) kriterlerine göre yapıldı ve değerlendirildi.

#### **3.2.4. DNA İzolasyonu**

İzolatlardan DNA izolasyonu ticari ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, BioRad) kullanılarak yapıldı.

#### **3.2.5. Antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi**

Tetrasiklin ve eritromisin dirençli izolatlarda *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS*, *ermA*, *ermB* ve *mefA/E* genlerinin belirlenmesi Malhotra-Kumar ve ark. (2005); vankomisin



dirençli izolatlarda *vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* ve *vanG* genlerinin belirlenmesi Depardieu ve ark. (2004); aminoglikozid dirençli izolatlarda *aac(6)-Ie-aph(2)-Ia*, *aph(2)-Ib*, *aph(2)-Ic*, *aph(2)-Id*, *aph(3)-IIIa* ve *ant(4)-Ia* genlerinin belirlenmesi Vakulenko ve ark. (2003); kloramfenikol dirençli izolatlarda *catA* geninin belirlenmesi Aerestrup ve ark. (2000) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı.

### **3.2.6. Virulens Genlerinin Belirlenmesi**

*Enterococcus* spp. türlerinde virulens genlerinden *gelE*, *cylA*, *ccf*, *efaA<sub>fs</sub>*, *efaA<sub>fm</sub>*, *cylM*, *cpd*, *cylB*, *cob* ve *aggA* genlerinin belirlenmesi Eaton ve Gasson (2001), *esp* geninin belirlenmesi Shankar ve ark. (1999) ve *eep* geninin belirlenmesi Marques ve Suzart (2004) tarafından bildirilen primerler ve yöntem kullanılarak belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolasyon ve identifikasyon sonuçları

Alınan 125 rektal svab örneğinin 107'sinden (%85.6) *Enterococcus* spp. izole edildi. İzolatların 96'sı (%89.7) *E. faecalis*, 9'u (%8.4) *E. faecium*, 1'i (%0.9) *E. hirae* ve 1'i de (%0.9) *E. durans* olarak identifiye edildi.

### 4.2. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları

İzolatların 22'si (%20.6) test edilen antibiyotiklerin tamamına duyarlı bulundu. Yüksek seviyede aminoglikozid, vankomisin ve teikoplanin direnci ise belirlenmedi. İzolatların tetrasiklin, eritromisin, siprofloksasin, kloramfenikol ve ampisiline olan direnç oranları izolatların sırasıyla %65.4 (70), %20.6 (22), %19.6 (21), %8.4 (9) ve %3.7 (4)'sinde tespit edildi. Onüç izolatta (%12.1) çoğul dirençlilik saptandı. Çoğul dirençlilik beş, dört ve üç farklı sınıftan antimikrobiyale sırasıyla bir (%0.9), bir (%0.9) ve 11 (%10.3) izolatta belirlendi. Bir ve iki antimikrobiyale direnç ise sırasıyla 60 (%56.1) ve 12 (%11.2) izolatta saptandı. İzolatların antimikrobiyallere olan duyarlılıkları Çizelge 2.3.de verilmiştir.

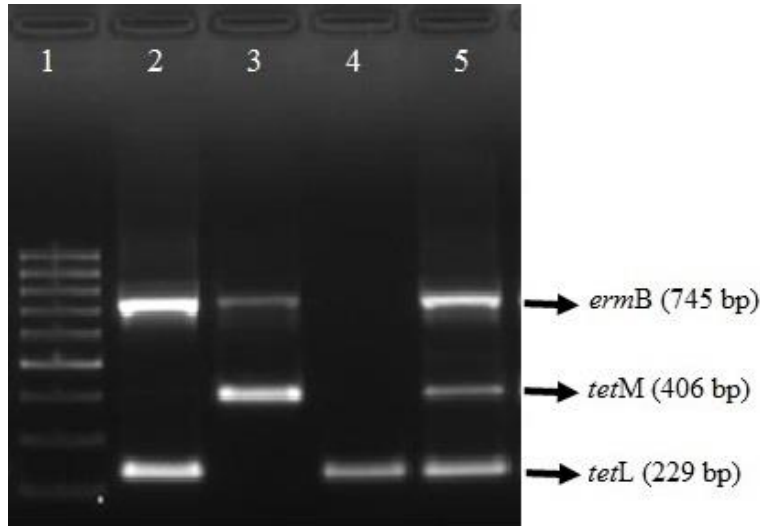
### 4.3. Antimikrobiyal direnç genleri

Tetrasiklin dirençli (n=70) izolatların 45'inde *tetM*, 12'sinde *tetL* ve *tetM*, 4'ünde *tetO*, 2'sinde *tetK* ve 2'sinde de *tetL* geni tespit edildi (Şekil 2.1). Eritromisin dirençli (n=22) izolatların 18'inde *ermB* geni belirlendi. *cat* geni ise kloramfenikol dirençli izolatların sadece birinde saptandı (Şekil 2.2).

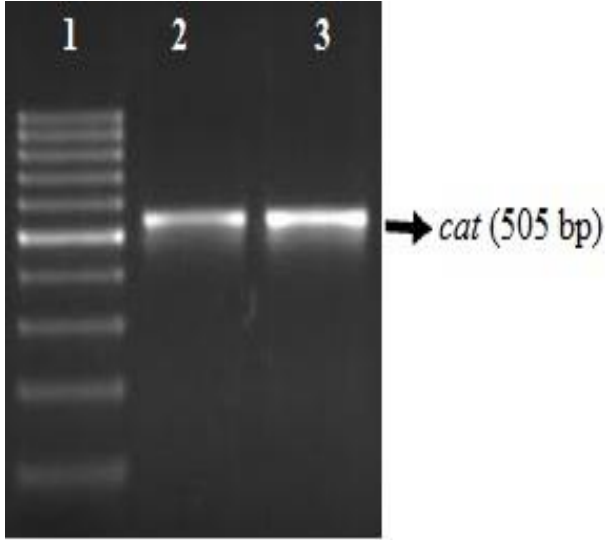
**Çizelge 2.3.** Enterokok türlerinde belirlenen direnç fenotipleri

Fenotip*	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>
AMP, TE, E, CIP, C	1			
TE, E, CIP, C	1			
AMP, TE, E		3		
TE, E, CIP	6			
TE, E, C	2			
TE, CIP	3			
TE, C	3			
TE, E	6			
CIP	9			1
TE	41	3	1	
E	3			
C	2			
Duyarlı	19	3		
<b>Toplam</b>	<b>96</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

\*AMP: Ampisilin, TE: Tetrasiklin, E: Eritromisin, CIP: Siprofloksasin, C: Kloramfenikol



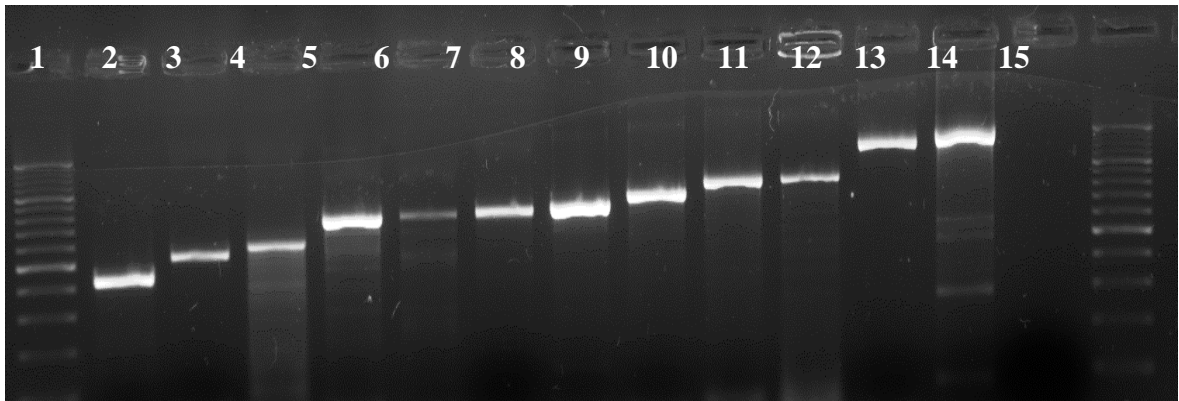
**Şekil 2.1.** Enterokok suşlarında belirlenen tetrasiklin ve makrolid direnç genlerine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuk 1: 100 bp moleküler marker, Kuyucuk 2: *ermB* ve *tetL*, Kuyucuk 3: *ermB* ve *tetM*, Kuyucuk 4: *tetM*, Kuyucuk 5: *ermB*, *tetL* ve *tetM*



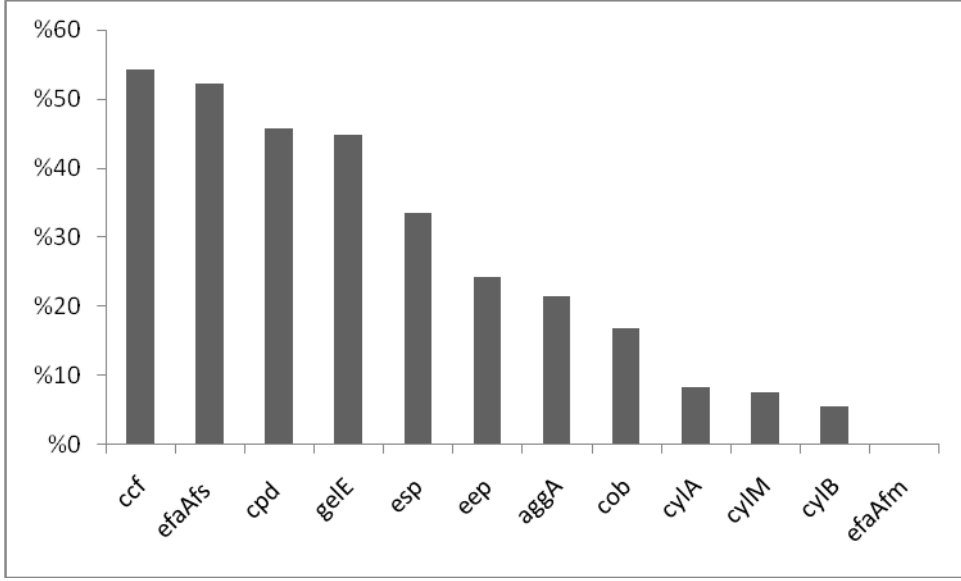
**Şekil 2.2.** Kloramfenikol dirençli enterokok suşlarında belirlenen *cat* direnç geninin ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuk 1: 100 bp moleküler marker, Kuyucuk 2: *cat* geni

#### 4.4. Virulens genlerinin prevalansı

Virulens genleri üç izolat hariç izolatların tamamında belirlendi. *efaA<sub>fm</sub>* geni izolatların hiçbirinde tespit edilmedi (Şekil 3). *ccf*, *efaA<sub>fs</sub>*, *cpd*, *gelE*, *esp*, *eep*, *aggA*, *cob*, *cylA*, *cylM* ve *cylB* virulens genleri izolatlar arasında sırasıyla %54.2, %52.3, %45.8, %44.9, %33.6, %24.3, %21.5, %16.8, %8.4, %7.5 ve %5.6 oranlarında tespit edildi (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Virulens genlerinin agaroz jel görüntüsü. Kuyucuk 1-15: 100 bp moleküler marker, Kuyucuk 2: *gelE* (419 bp), Kuyucuk 3: *cylA* (517 bp), Kuyucuk 4: *ccf* (543 bp), Kuyucuk 5: *efaA<sub>fs</sub>* (705 bp), Kuyucuk 6: *efaA<sub>fm</sub>* (735 bp), Kuyucuk 7: *cylM* (742 bp), Kuyucuk 8: *cpd* (782 bp), Kuyucuk 9: *cylB* (843 bp), Kuyucuk 10: *esp* (933 bp), Kuyucuk 11: *eep* (937 bp), Kuyucuk12: *cob* (1,405 bp), Kuyucuk 13: *aggA* (1553 bp), Kuyucuk 14: Negatif kontrol



**Şekil 2.4.** Enterokok izolatlarında virulens genlerinin dağılımı



## 5. TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç tüm dünyada insan ve hayvan sağlığı yönünden önemli bir sorun haline gelmiştir. Enterokoklar insan ve hayvanların gastrointestinal sistemini de içeren farklı yaşam alanlarında yaygın olarak bulunan etkenler olarak bilinse de, çoğul dirence sahip enterokoklar nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen etkenlerinden biri haline gelmiştir (Lebreton ve ark. 2014, Agudelo Higuaita ve Huycke 2014). Chung ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada dirençli enterokok türlerinin köpek, insan ve hastane ortamları arasında bulaştığı gösterilmiştir.

İncelenen 107 enterokok izolatu arasında en sık izole tür *E. faecalis* (% 89.7) olarak bulundu. Bunu *E. faecium* (% 8.4) izledi. Buna karşılık, Türkiye'de yapılan daha önceki çalışmalarda köpeklerden izole edilen en yaygın tür *E. faecium* olarak rapor edilmiştir (Boynukara ve ark. 2002, Türkyılmaz ve ark. 2010). Ayrıca, *E. faecalis*'in köpeklerin (KuKanich ve Lubbers 2015) ve insanların (Etiz ve ark. 2014) idrar yolu enfeksiyonlarından yaygın olarak izole edildiği bildirilmiştir.

Pet hayvanlarında antimikrobiyal ajanların artan kullanımı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Guardabassi ve ark. 2004). Bu çalışmada enterokok suşlarında gözlenen antimikrobiyal direnç oranları Aydın ilinde Türkyılmaz ve ark. (2010) tarafından bildirilen direnç oranlarından düşük, fakat Van ilinde Boynukara ve ark. (2002)'nin bulgularından yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, enterokoklarda saptanan direnç oranlarının bölgesel olarak değişebileceğini ve antibiyotik kullanımından etkilenebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, Boynukara ve ark. (2002), çalışmalarında köpeklerin orijinlerinden söz etmemiştir.

Bu çalışmada tetrasikline direnç oranı (%65.4) Boynukara ve ark. (2002)'nin bulgularından (% 41.1) yüksek, ancak Türkyılmaz ve ark. (2010)'nin bulgularından (% 70.3) ise daha düşüktür. Çalışmada saptanan yüksek direnç oranı Türkiye'de bu antibiyotığın yaygın olarak kullanılması ile açıklanabilir. Çalışmada eritromisin direnç oranı (%20.6) Boynukara ve ark. (2002)'nin bulgularına (% 21.1) benzerlik göstermiştir. Ancak, Türkyılmaz ve ark. (2010) ise daha yüksek eritromisin direnci (% 69.2) bildirilmiştir.

Benzer şekilde, bu çalışmada da vankomisine karşı direnç gözlenmedi. Bununla birlikte, köpeklerden izole edilen *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türleri arasında *vanC*

geni tarafından kodlanan intrinsik direnç bildirilmiştir (Türkyılmaz ve ark. 2010, Bağcıgil ve ark. 2016, Bağcıgil ve ark. 2015). Klinik olarak önemli bir ilaç olan siprofloksasine direnç, Boynukara ve ark. (2002)'nin bulgularının (%6.7) aksine yüksek bulunmuştur (% 19.6). Bu çalışmada saptanan kloramfenikol direnç oranı (%8.4) ise Türkyılmaz ve ark. (2010)'nin bulguları ile (% 12.1) karşılaştırılabilir düzeydedir.

Ampisilin, yüksek seviyede aminoglikozid direnci göstermeyen çoklu ilaç direnci gösteren enterokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozidlerle kombine olarak kullanılması tercih edilen bir antibiyotiktir (Arias ve ark. 2010). Ayrıca ampisiline dirençli enterokoklar genellikle köpeklerde kullanılan diğer antimikrobiyallere de dirençlidir (Damborg ve ark. 2008). Ampisilin direncinin prevalansı bu çalışmada düşük (% 3.7) bulunsa da; ampisilin direnci hem insan hem de hayvan sağlığı için önemli bir risk oluşturmaktadır ve bu nedenle de köpeklerde ampisilin dirençli enterokok suşlarının gerçek prevalansının belirlenmesi için selektif besiyerlerinin kullanılması gereklidir. Çelik ve ark. (2017) tarafından selektif besiyeri kullanarak yapılan bir çalışmada ampisiline dirençli enterokok prevalansı %20.9 olarak bildirilmiştir.

Tetrasiklin dirençli enterokok izolatlarında *tetM* en yaygın direnç geni olarak belirlendi. Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarda tavuk eti örneklerinden (Yılmaz ve ark. 2016), peynir örneklerinden (Kürekci ve ark. 2016) ve köpeklerden alınan rektal sıvab örneklerinden (Türkyılmaz ve ark. 2010) izole edilen tetrasikline dirençli enterokok suşlarında da dominant olarak *tetM* geni belirlenmiştir. *tetM* geninin yaygın olarak saptanması enterokoklarda bu genin sıklıkla *Tn946* tarafından taşınmasına bağlanmaktadır (Leener ve ark. 2005). Enterokoklar arasında makrolidlere karşı temel direnç mekanizması, 23S rRNA'nın *erm* metilazlar tarafından modifikasyonudur (Leclercq 2002). Bu çalışmada makrolid dirençli enterokoklarda sadece *ermB* geni tespit edildi. Benzer şekilde, Türkyılmaz ve ark. (2010) *ermB* geninin prevalansının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kloramfenikol direncinden sorumlu *cat* geni bu çalışmada çok düşük bir oranda (% 22.2) bulunmuştur. Bu durum, kazanılmış diğer direnç genlerinin varlığını veya bu direnç fenotipinden sorumlu mekanizmaların varlığını düşündürmektedir. Yılmaz ve ark. (2016)'nin yaptığı bir çalışmada, tavuk etlerinden izole edilen kloramfenikol dirençli enterokoklarda *cat* geninin prevalansı düşük oranda (%4.8) rapor edilmiştir. Aksine, Türkyılmaz ve ark. (2010) kloramfenikole dirençli enterokok suşlarında *cat* geninin prevalansını % 63.6 olarak tespit etmişlerdir.

Enterokoklar enfeksiyonun seyrine ve şiddetine katkıda bulunan çeşitli virulans faktörleri üretme kabiliyetine sahiptir (Mundy ve ark. 2000). *efaA<sub>fs</sub>* ve *efaA<sub>fm</sub>* enfektif endokardit ile ilişkilendirilen hücre duvarı adezinleridir. Bu çalışmada, *efaA<sub>fs</sub>* *E. faecalis* izolatlarının %58.3'ünde saptanırken; *efaA<sub>fm</sub>* geni *E. faecium* izolatlarında tespit edilmedi. Iseppi ve ark. (2015) *E. faecalis* izolatlarının % 33.3'ünde *efaA<sub>fs</sub>* genini ve *E. faecium* izolatlarının %50'sinde ise *efaA<sub>fm</sub>* genini bulmuşlardır.

Sitolizin bir bakteriyosin tipi ekzotoksindir ve etkisini eritrosit, lökosit ve makrofajlara karşı gösterir (Sava ve ark. 2010). *cyIA*, *cyIM* ve *cyIB* genleri izolatların sırasıyla %8.4, %7.5 ve % 5.6'sında tespit edildi. Iseppi ve ark. (2015) bu genleri sırasıyla *E. faecalis* izolatlarının %8.3'ünde, %8.3'ünde ve %8.3'ünde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, *E. faecium* izolatlarında sadece *cyIM* geni (%7.1) tespit edilmiştir. Gülhan ve ark. (2006), insanlardan ve evcil hayvanlardan izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında sitolizin aktivitesini araştırmışlar ve kedi orijinli bir *E. faecium* izolatı hariç, köpek izolatlarında hiçbir sitolitik aktivite tespit etmemişlerdir.

*gelE* çinkoya bağımlı bir metaloendopeptidazdır ve jelatin, elastin, kollajen ve hemoglobini hidrolize etme yeteneğine sahiptir (Sava ve ark. 2010). Jelatinazın ayrıca endokardit gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve anafilotoksin aktivitesine sahip komplementin C5a parçasını yıkımlamak suretiyle enfeksiyon bölgesine nötrofil birikimini azalttığı bildirilmiştir (Thurlow ve ark. 2010). Bu çalışmada, izolatların % 44.9'unda *gelE* geni tespit edildi. Bununla birlikte, Iseppi ve ark. (2015) sırasıyla *E. faecium* izolatlarının %57.1'inde ve *E. faecalis* izolatlarının %80.3'ünde bu geni tespit etmişlerdir. Gülhan ve ark. (2006) *E. faecium* izolatlarının %26.6'sını ve *E. faecalis* izolatlarının ise %60'ını jelatinaz aktivitesi yönünden pozitif bulmuşlardır.

Agregasyon maddesi (AS) bakteriyel konjugasyonu kolaylaştıran mating agregatlarının formasyonuna katkıda bulunan enterokok yüzey proteindir (Sava ve ark. 2010). Bu çalışmada, izolatların %21.5'i *aggA* geni yönünden pozitif tespit edildi. Iseppi ve ark. (2015) bu geni tespit edememişler ve izolatların virulans genlerini konjugasyon ile aktarma yeteneklerinin düşük olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Gülhan ve ark. (2006) tarafından da çok düşük bir oran bildirilmiş ve araştırmacılar sırasıyla *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında %1.6 ve %6.7 oranlarında pozitiflik tespit etmişlerdir.

Enterokoklar hücreler arasında konjugatif plazmid transferini kolaylaştıran cinsiyet feromonları (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*) üretme kabiliyetine sahiptir (Sava ve ark. 2010). Cinsiyet



feromon genleri, *ccf*, *cpd*, *cob* ve *eep*, izolatların %54.2, % 45.8, %16.8 ve %24.3'ünde saptanmıştır. Yılmaz ve ark. (2016) et örneklerinden izole ettikleri enterokok suşlarında cinsiyet feromonlarının prevalansını daha yüksek oranda bildirmişlerdir.

*esp* geninin biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Biyofilm üretiminin, hücreler arasında antibiyotik direnç genlerinin karşılıklı transferinde ve antibiyotiklere karşı direncinin arttırılmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Sava ve ark. 2010). Bu çalışmada, *esp* geni izolatların %33.6'sında tespit edildi. Buna karşılık, Iseppi ve ark. (2015) izolatlar arasında bu geni tespit edememişlerdir. Ayrıca, Oliveira ve ark. (2016), periodontal hastalığı olan köpeklerden izole edilen enterokoklarda daha düşük prevalans oranı (%10) rapor etmişlerdir.

Enterokok izolatlarında yukarıda belirtilen virulens genlerinin dağılımında görülen değişiklikler beslenme şekilleri ve coğrafik farklılıklara bağlanabilir.

## 6. SONUÇ

Yapılan bu çalışma, köpeklerin potansiyel olarak virulent ve antibiyotik dirençli enterokoklarla kolonize olduklarını göstermektedir. Bu nedenle, enterokokların köpeklerden insanlara, özellikle de risk grubundaki insanlara bulaşma ihtimali göz ardı edilmemelidir. Ayrıca, köpeklerden ve köpek sahiplerinden enterokok suşları arasındaki klonal ilişkiyi analiz ederek insanlara bulaşma riskini aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.



## 7. KAYNAKLAR

1. **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. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2000**, s. 37: 127-137.
2. **Agudelo Higueta NI, Huycke MM.** Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors: Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649513>. **2014**. Accession date: 10.03.2017.
3. **Akan M.** Enterekok Enfeksiyonları. In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), N Aydın, J Paracıkoğlu (Ed) , İlke Emek Yayınları, Ankara. **2006**, 27-29.
4. **Aktaş G, Derbentli Ş.** Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi.* **2009**, s. 23: 201-209.
5. **Arias CA, Murray BE.** The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews. Microbiology*, **2012**, s. 10:266-78.
6. **Arias CA, Contreras GA, Murray BE.** Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* **2010**, s. 16(6): 555-562.
7. **Arias CA, Courvalin P, Reynolds PE.** vanC cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**, s. 44: 1660.
8. **Arias CA, Martín-Martinez M, Blundell TL, Arthur M, Courvalin P ve ark.** Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol.* **1999**, s. 31:1653.
9. **Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P.** The vanZ gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene.* **1995**, s. 154:87.
10. **Arthur M, Courvalin P.** Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* **1993**, s. 37:1563-1571.
11. **Azimi Mahalleh A, Göncüoğlu M.** Enterokokların önemli virülens faktörleri ve gıdalarda bulunuşu. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* **2014**, s. 25 (2): 47-52.
12. **Bağcıgil AF, Koehemsi L, Çelik B, Metiner K, Or ME, ve ark.** Examination of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) Isolated from Canine and Feline Rectal Swabs. *J Fac Vet Med Istanbul Univ,* **2016**, s. 42(2): 111-116, 2016.
13. **Bağcıgil AF, İkiz S, Ak S, Özgür NY.** Isolation of Vancomycin Resistant Enterococci from Animal Faeces, Detection of Antimicrobial Resistance Profiles and Vancomycin Resistant Genes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* **2015**, s. 21(1): 87-94.
14. **Boynukara B, Ekin İH, Aksakal A, Gülhan T.** Isolation and antibiotic susceptibility of enterococci from human, dog and cat faeces. *Vet Hek Mikrobiyol Derg.* **2002**, s. 2(1): 37-42.
15. **Çelik B, Bağcıgil AF, Koehemsi L, Adıgüzel MC, Or ME ve ark.** Determination of Ampicillin Resistant Enterococci (ARE) Isolated From Canine and Feline Rectal Swabs. *J Fac Vet Med Istanbul Univ.* **2017**, s. 43 (1): 1-6.
16. **ChajECKa-Wierzchowska W, ZaderNowska A, Łaniewska-Trokenheim Ł.** Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT-Food Science and Technology*, **2017**, s. 75:670-676.
17. **Clinical Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial testing: Twentieth informational supplement. Document M100-S20, Clinical Laboratory Standards Institute; Wayne, PA 2010.
18. **Chopra I, Roberts M.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2001**, s. 65:232-260.
19. **Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM ve ark.** Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* **1993**, s. 37(11):2474-2477.
20. **Chung YS, Kwon KH, Shin S, Kim JH, Park YH ve ark.** Characterization of veterinary hospital-associated isolates of *Enterococcus* species in Korea. *J Microbiol Biotechnol*, **2014**, s. 24(3): 386-393.
21. **Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P.** Characterization of the chromosomal aac(6)-II gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1993**, s. 37:1896.
22. **Courvalin P, Carlier C, Collatz E.** Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol.* **1980**, s. 143:541.

- 23.Çöleri A, Çökmüş C.** Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. **2008**, s. 65(2): 87- 96.
- 24.Damborg P, Sørensen AH, Guardabassi L.** Monitoring of antimicrobial resistance in healthy in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet Microbiol*. **2008**, s.132(1-2):190-196.
- 25.De Leener E, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F.** Distribution of the erm(B) gene, tetracycline resistance genes and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist*. **2004**, s.10:341-345.
- 26.Deibel RH.** The Group D Streptococci. *Bacteriol Rev*. **1964**, s. 28:330-366.
- 27.Depardieu F, Perichon B, Courvalin P.** Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **2004**, s. 42, 5857-5860.
- 28.Dicuonzo G, Gherardi G, Lorino G, Angeletti S, Battistoni F ve ark.** Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. *FEMS Microbiol Lett*. **2001**, s. 201(2):205-211.
- 29.Eaton TJ, Gasson MJ.** Molecular screening of *enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, **2001**, s. 67:1628– 1635.
- 30.Eliopoulos GM, Farber BF, Murray BE, Wennersten C, Moellering RC Jr.** Ribosomal resistance of clinical enterococcal to streptomycin isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. **1984**, s. 25:398.
- 31.Etöz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A.** İdrar Kültüründen İzole Edilen Enterokok Türlerinin Antibiyotik Direnç Profillerinin Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2014**, s. 44(3): 107-113.
- 32.Facklam R, HollisD, Collins MD.** Identification of gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *J ClinMicrobiol*, **1989**, s. 27:724-730.
- 33.Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P.** VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*. **1999**, s. 43: 2161- 2164.
- 34.Fontana R, Ligozzi M, Pittaluga F, Satta G.** Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb Drug Resist*. **1996**, s. 2:209.
- 35.Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J ve ark.** Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*. **2001**, s. 67(9):4385-9.
- 36.Galli D, Lottspeich F, Wirth R.** Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol*, **1990**, s. 4(6):895-904.
- 37.Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE.** Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS One*, **2012**, s. 7: e30187.
- 38.Galloway-Peña JR, Rice LB, Murray BE.** Analysis of PBP5 of early U.S. isolates of *Enterococcus faecium*: sequence variation alone does not explain increasing ampicillin resistance over time. *Antimicrob Agents Chemother*. **2011**, s. 55:3272.
- 39.Galloway-Peña JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE.** Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis*. **2009**, s. 200:1566-73.
- 40.Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, Swings J, Cogan TM.** Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheese making factory. *Int J FoodMicrobiol*. **2001**, s. 71:177-188.
- 41.Geraci JE, Martin WJ.** Antibiotic therapy of bacterialendocarditis. VI. Subacute enterococcal endocarditis; clinical, pathologic and therapeutic consideration of 33 cases. *Circulation*, **1954**, s. 10:173.
- 42.Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, De Girolami PC ve ark.** Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother*. **1991**, s. 35:2180.
- 43.Gu L, Cao B, Liu Y, Guo P, Song S ve ark.** A new Tn1546 type of VanB phenotype-vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2009**, s. 63:70.
- 44.Guardabassi L, Agersø Y.** Genes homologous to glycopeptide resistance vanA are widespread in soil microbial communities. *FEMS Microbiol Lett*, **2006**, s. 259:221-225.
- 45.Guardabassi L, Christensen H, Hasman H, Dalsgaard A.** Members of the genera Paenibacillus and Rhodococcus harbor genes homologous to enterococcal glycopeptide resistance genes vanA and vanB. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**, s. 48: 4915-4918.
- 46.Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH.** Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*, **2004**, s. 54: 321-332

47. Gülhan T, Aksakal A, Ekin İH, Savaşan S, Boynukara B. Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Humans and Pets. *Turk J Vet Anim Sci*, 2006, s. 30: 477-482.
48. Havard CW, Garrod LP, Wh PM. Deaf or dead? A case of subacute bacterial endocarditis treated with penicillin and neomycin. *Br Med J*, 1959, s. 1:688.
49. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM ve ark. HSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008, s. 29, 996-1011.
50. Iseppi R, Messi P, Anacarso I, Bondi M, Sabia C ve ark. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiol*, 2015, s. 38(3): 369-378.
51. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 2005, s. 41: S120-S126.
52. Knudtson LM. ve Hartman PA. Enterococci in pork processing. *J Food Protect*, 1993, s. 56:6-9.
53. Kohler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *IJMM*, 2007, s. 297:133-150.
54. KuKanich KS, Lubbers BV. Review of enterococci isolated from canine and feline urine specimens from 2006 to 2011. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2015, s. 51(3): 148-154.
55. Kürekcı C, Önen SP, Yipel M, Aslantaş Ö, Gündoğdu A. Characterisation of Phenotypic and Genotypic Antibiotic Resistance Profile of Enterococci from Cheeses in Turkey. *Korean J Food Sci Anim Resour*, 2016, s. 36(3): 352-388.
56. Lam MM, Seemann T, Bulach DM, Gladman SL, Chen H ve ark. Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. *J Bacteriol*. 2012, s. 194: 2334-2341.
57. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649513>. 2014. Accession date: 10.03.2017.
58. Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P ve ark. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, s. 55:4606-4612.
59. Leclercq R: Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Review. *Clin Infect Dis*. 2002, 34:482-492.
60. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis*. 1997, s. 24:545-554.
61. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene vanC is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992, s. 36:2005-2008.
62. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*, 1988, s. 319: 157-61.
63. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991, s. 35: 1267-1272.
64. Leelaporn A, Yodkamol K, Waywa D, Pattanachaiwit S. A novel structure of Tn4001-truncated element, type V, in clinical enterococcal isolates and multiplex PCR for detecting aminoglycoside resistance genes. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, s. 31:250-254.
65. Leener ED, Decostere A, De Graef EM, Moyaert H, Haesebrouck F. Presence and mechanism of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs. *Microb Drug Resist*, 2005, s. 11(4): 395-403.
66. Mainardi JL, Morel V, Fourgeaud M, Cremniter J, Blanot D ve ark. Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*. 2002, s. 277:35801.
67. Mainardi JL, Legrand R, Arthur M, Schoot B, van Heijenoort J ve ark. Novel mechanism of beta-lactam resistance due to bypass of DD-transpeptidation in *Enterococcus faecium*. *J Biol Chem*. 2000, s. 275:16490.
68. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005, s. 49: 4798-4800.
69. Marques BE, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol*, 2004, s. 53: 1069-1073.
70. Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis*. 1983, s. 147:751.

- 71.Mevius D, Devriese L, Butaye P, Vandamme P, Verschure M ve ark.** Isolation of glycopeptide resistant *Streptococcus gallolyticus* strains with vanA, vanB, and both vanA and vanB genotypes from faecal samples of veal calves in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother*, **1998**, s. 42:275.
- 72.Moore DF, Guzman JA, McGee C.** Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *J Appl Microbiol*, **2008**, s. 105:1017-25.
- 73.Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M.** Relationships between enterococcal relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, **2000**, 13(4): 513-522.
- 74.Murray BE.** The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*. **1990**, s. 3: 46-65.
- 75.Navarro F, Courvalin P.** Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1994**, s. 38:1788-1793.
- 76.Oliveira M, Tavares M, Gomes D, Touret T, São Braz B ve ark.** Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **2016**, s. 46: 27-31.
- 77.Parker ML, Gunning PA, Macedo AC, Malcata FX, Brocklehurst TF.** The microstructure and distribution of microorganisms within mature Serra cheese. *J Appl Microbiol*. **1998**, s. 84:523-530.
- 78.Reynolds PE, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P.** Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol Microbiol*, **1994**, s. 13:1065.
- 79.Reynolds PE, Arias CA, Courvalin P.** Gene vanXYC encodes D,D-dipeptidase (VanX) and D,D-carboxypeptidase (VanY) activities in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol*. **1999**, s. 34:341.
- 80.Reynolds PE.** Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **1989**, s. 8:943-950.
- 81.Rice LB.** Controlling antibiotic resistance in the ICU: different bacteria, different strategies. Review. *Cleve Clin J Med*. **2003**, s.70(9):793-800.
- 82.Rice LB.** Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*. **1998**, s. 42:1871-1877.
- 83.Roberts MC, Hillier SL.** Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. **1990**, s. 34:261-264.
- 84.Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J ve ark.** Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*. **1999**, s. 43: 2823-2830.
- 85.Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A.** Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog*. **2001**, s. 30(4):211-220.
- 86.Sava IG, Heikens E, Huebner J:** Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*, **2010**, s. 16: 533-540
- 87.Schleifer KH, Kilpper-Bälz R.** Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus enterococcus nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. *Int J Sys. Bacteriol*. **1984**, s. 34: 31-34.
- 88.Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L.** Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol*. **2002**, s.46(1):157-68.
- 89.Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P ve ark.** Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*. **2000**, s. 66: 2263-2266.
- 90.Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS.** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, **1999**, s. 67: 193-200.
- 91.Stinear TP, Olden DC, Johnson PD, Davies JK, Grayson ML.** Enterococcal vanB resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet*. **2001**, s. 357:855.
- 92.Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson G ve ark.** Direct rDNA Community Analysis Reveals a Myriad of Novel Bacterial Lineages within the Human Gut. *Appl Environ Microbiol*, **1999**, s. 65: 4799-4807.
- 93.Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin P, Duval J, Leclercq R.** Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. *Antimicrob Agents Chemother*. **1996**, s. 40:2558-2561.

- 94.Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD ve ark.** Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. **2010**, s. 78(11): 4936-4943.
- 95.Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K ve ark.** Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*. **2007**, s. 13:316-319.
- 96.Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA.** Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). *J Clin Microbiol*, **2005**, s.43:462-463.
- 97.Türkyılmaz S, Erdem V, Bozdoğan B.** Investigation of antimicrobial susceptibility for enterococci isolated from cats and dogs and the determination of resistance genes by polymerase chain reaction. *Turk Vet J Anim Sci*, **2010**, s. 34: 61-68
- 98.Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC.** Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. **1998**, s. 1: 57-58.
- 99.Vakulenko SB, Zervos MJ, Donabedian SM, Lerner SA, Voskresenskiy AM ve ark.** Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. **2003**, s. 47:1423-1426.
- 100.Yıldırım M.** Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyonlar. *Düzce Üniv. Tıp Fak. Derg*, **2007**, s. 2:46-52.
- 101.Yıldız Ö.** Mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* suşlarının virulens genlerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, **2014**.
- 102.Yılmaz EŞ, Aslantas Ö, Pehlivanlar Onen S, Türkyılmaz S.** Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. *LWT - Food Sci Technol*, **2016**, s. 66: 20-26.
- 103.Zhong P, Cao Z, Hammond R, Chen Y, Beyer J ve ark.** Induction of ribosome methylation in MLS-resistant *Streptococcus pneumoniae* by macrolides and ketolides. *Microb Drug Resist*. **1999**, s. 5:183-188.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Hatay İli'nin İskenderun İlçesi'nde doğdu. İlköğrenimini 1990-1998 yılları arasında Kırıkhan 5 Temmuz İlkokulu'nda tamamladıktan sonra Ortaöğrenimini 1998-2002 arasında Kırıkhan Naim Atakaş Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında girmiş olduğu Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2008 yılında mezun oldu. 2011 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı; Mersin İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nde göreve başladı. Halen Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hatay İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü emrinde görev yapmaktadır. Evli ve 2 çocuk babasıdır.

