

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDRAR VE GAİTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECALIS VE *ENTEROCOCCUS FAECIUM*
SUŞLARININ BİYOTİPLENDİRİLMESİ VE BAZI
ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Gülşah TOLLU
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından
2014-SBE-YL041 No’lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2015

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDRAR VE GAİTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECALIS VE *ENTEROCOCCUS FAECIUM*
SUŞLARININ BİYOTİPLENDİRİLMESİ VE BAZI
ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Gülşah TOLLU
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Ziya İLHAN

Üye
Prof. Dr. Kamil EKİCİ

Üye (Danışman)
Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN

TEZ KABUL TARİHİ
05 / 01 / 2015

TEŞEKKÜR

Çalışmamda hoşgörü ve sabırlarını esirgemeyen, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinin her aşamasında yardım ve önerileriyle büyük desteğini gördüğüm başta danışman hocam sayın Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN olmak üzere, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı üyelerinden Prof. Dr. Ziya İLHAN'a, Arş. Gör. Özgül GÜLAYDIN'a, Yüksek Lisans dönem arkadaşım Sevil ATEŞ ve Samet KOLTAŞ'a, istatistiksel analizlerin yapılmasında katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Abdullah YEŞİLOVA'ya, materyallerin toplanmasında destek sağlayan Van Bölge Eğitim Araştırma Hastanesi personeline, çalışmalarım esnasında büyük fedakarlıklarda bulunan ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve eşim Dr. Buğra TOLLU'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Ayrıca, çalışmaya maddi destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Tablolar Listesi	VII
Şekiller Listesi	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Enterokoklar ve Genel Özellikleri	5
2.1.1. Enterokokların sınıflandırılması	5
2.1.2. Enterokokların morfolojik, kimyasal ve antijenik yapıları	6
2.1.3. Enterokokların virulens ve patojenite faktörleri	7
2.1.4. Enterokokların epidemiyolojik özellikleri	8
2.1.5. Enterokokların klinik infeksiyonları	9
2.2. Enterokoklarda Antimikrobiyel Duyarlılık	11
2.2.1. Araştırmada kullanılan antimikrobiyel maddeler ve etki mekanizmaları	14
2.3. Enterokokların PCR İle Teşhisi	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. İdrar ve gaita örnekleri	19
3.1.2. Bakteri izolatları	19
3.1.3. Referans suşlar	19
3.1.4. Besiyerleri	19
3.1.5. Antimikrobiyel maddeler	19
3.1.6. Çözeltiler ve test ortamları	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. İdrar ve gaita örneklerinin alınması	21
3.2.2. Bakteriyel izolasyon	21
3.2.3. İdentifikasyon	21
3.2.3.1. Katalaz testi	21

3.2.3.2. Enterokok izolatlarının PCR ile identifikasyonu	22
3.2.4. Biyotiplendirme	23
3.2.4.1. %6.5 NaCl ortamında üreme	23
3.2.4.2. Hemoliz testi	24
3.2.4.3. Eskulin hidrolizi	25
3.2.4.4. Arjinin hidrolizi	25
3.2.4.5. Karbonhidrat fermentasyon testleri	25
3.2.4.6. SIM besiyerinde üreme	26
3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi	26
3.2.6. İstatistiksel analiz	26
4. BULGULAR	27
4.1. Enterokok Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu	27
4.2. Enterokok Suşlarının Biyotiplendirilmesi	27
4.3. Antimikrobiyel Duyarlılık Test Sonuçları	32
4.3.1. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının antimikrobiyel duyarlılıkları	33
4.3.2. <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının antimikrobiyel duyarlılıkları	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	36
ÖZET	47
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	58
EKLER	59
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	59
Ek 2. Hasta Onam Formu	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Colection
CLSI	: Clinical and Laboratory Standard Institute
BHI	: Brain Heart Infusion
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR	: Polymerase Chain Reaction
VRE	: Vankomisine Dirençli Enterokok

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	İncelenen <i>Enterococcus</i> spp. suşlarının biyokimyasal özellikleri	24
Tablo 2.	İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen enterokoklar ve dağılımları	27
Tablo 3.	<i>Enterococcus faecalis</i> ve <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçları	29
Tablo 4.	<i>Enterococcus faecalis</i> ve <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının biyotip profillerinin dağılımları	32
Tablo 5.	Araştırmada kullanılan antimikrobiyel ajanların disk difüzyon yöntemine göre değerlendirme kriterleri ve zon çapları	32
Tablo 6.	<i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilen <i>in vitro</i> antimikrobiyel duyarlılık test sonuçları.....	33
Tablo 7.	<i>Enterococcus faecium</i> suşlarının disk difüzyon yöntemi ile tespit edilen <i>in vitro</i> antimikrobiyel duyarlılık test sonuçları	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Enterokokların hücre duvarı kompozisyonu	6
Şekil 2.	Enterokokların PCR ile analizlerinin agaroz jel görüntüsü	28
Şekil 3.	<i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının biyotip dağılımı ve benzerlik oranları	30
Şekil 4.	<i>Enterococcus faecium</i> suşlarının biyotip dağılımı ve benzerlik oranları	31
Şekil 5.	<i>Enterococcus faecalis</i> suşların disk diffüzyon yöntemi ile tespit edilen <i>in vitro</i> antimikrobiyel duyarlılıklarının dağılımı	34
Şekil 6.	<i>Enterococcus faecium</i> suşlarının disk diffüzyon yöntemi ile tespit edilen <i>in vitro</i> antimikrobiyel duyarlılıklarının dağılımı	35

1. GİRİŞ

Enterokoklar, insan ve hayvan sağlığında önemli sağlık sorunları yaşıatabilen fırsatçı patojen niteliğindeki mikroorganizmalardan biridir. Yaygın olarak deri, alt solunum yolu, gastrointestinal ve üregenital sistem florasında bulunmakla birlikte, idrar yolu infeksiyonları, menenjit, endokardit gibi endojen ve ekzojen kaynaklı infeksiyonlara da neden olabilmektedirler (Schouten ve ark., 1999; Dargere ve ark., 2002; Devriese ve ark., 2006). Enterokok türleri arasında hastalık olgularından en çok izole edilenlerin *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*, daha az oranda ise *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. solitarius* ve *E. hirae* gibi türler olduğu bildirilmektedir (Schouten ve ark., 1999; Rodrigues ve ark., 2002).

Enterokokların önemli bir patojen haline gelmeleri birçok nedenden kaynaklanmaktadır (Butler, 2006). Duyarlı populasyonun hızındaki artış (immün yetmezlik ve kritik hastalıklar gibi), intravasküler kateter kullanımındaki artış, hastanede yatış süresinde uzama, antibiyotiklerin yoğun kullanımı (özellikle sefalosporinler ve anti-stafilokokal penisilinlerin) enterokokları doğal olarak dirençli hale getirmiştir. Önceleri enterokokkal infeksiyonların genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen infeksiyonlar olduğu düşünölmekteydi. Ancak yapılan çalışmalarda, enterokokların ekzojen yolla da yayılabileceği gösterilmiştir. Özellikle dirençli enterokok türleri, hastadan hastaya veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabilmekte ve böylece hastane içinde veya hastaneler arasında kolaylıkla yayılabilmektedir (Moellering, 1992; Herwaldt ve Wenzel, 1995).

Enterokokların çevresel kaynaklardan bulaşabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, risk faktörleri, direncin belirlenmesi, tarama prosedürleri ve kontrol önlemleri iyi bilinmelidir. Enterokokların epidemiyolojik araştırmasında kullanılan bakteriyosin tiplendirme, faj tiplendirme, biyokimyasal reaksiyon profilleri, antimikrobiyel duyarlılıkları ve serolojik testler gibi klasik fenotiplendirme yöntemleri yetersiz ve yararları sınırlıdır. Moleküler tiplendirme ise antimikrobiyel ajanlara dirençli enterokokların incelenmesi, önlenmesi ve yayılmalarının kontrol edilmesinde çok daha yardımcı bir yöntem olarak görölmektedir (Teixeira, 2007).

Yapılan bazı çalışmalarda enterokok suşlarının izolasyon ve identifikasyonunda standart olarak Gram boyama, katalaz testi, %40 safra içeren eskülinli agar besiyerinde üreme, eskülin hidrolizi ve %6.5 NaCl'li brain heart infüzyon broth (BHI) besiyerinde üreme özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bu testlerde Gram pozitif, katalaz negatif, %6.5 NaCl'li BHI broth ve %40 safra içeren eskülinli agar besiyerinde üreyebilen, eskülin pozitif suşlar enterokok olarak tanımlanmaktadır (Koneman ve ark., 1997).

Moleküler genetik teknolojide kaydedilen gelişmeler sonucu enterokoklar taksonomik analizlerle son zamanlarda *Streptococcus* cinsinden çıkartılarak ayrı bir cins olarak sınıflandırılmıştır. Toprak, su, yiyecekler, insan ve hayvanların barsak, safra yolları, ağız ve bazen de derilerinin (özellikle perineal deri) normal florasında bulunmaktadır. 10-45°C arasında üreyebilen, 60°C'de 30 dk dahi canlılığını sürdürebilen bakterilerdir. Uygun koşullarda insanlarda çeşitli infeksiyonlara yol açmaktadır. Klinik olarak diğer streptokokların duyarlı olduğu antimikrobiyellere karşı dirençli olmaları nedeniyle, özellikle nozokomiyal patojen olarak klinik önemleri giderek artmaktadır (Unat, 1986; Koneman ve ark., 1997; Moellering, 2000).

E. faecalis ve *E. faecium* insan ve sığırların gastrointestinal flora üyeleridir. Bu patojenler ağız, hepatobiliyer sistem, vajina, yiyecek, sebze, yemler, üriner sistem infeksiyonu, yara, periton sıvısı, derin pelvik apseler, endokardit ve kan kültürlerinden izole edilmiştir. *E. faecalis* beta hemolitik olup %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer ve insanda en fazla izole edilen etkindir. *E. faecium* alfa hemolitik olup %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da üremektedirler (Barrie ve ark., 1990; Chenoweth ve Schaberg, 1990; Eliopoulos ve Eliopoulos, 1990; Koneman ve ark., 1997).

Enterokokların tiplendirilmesinde ticari biyokimyasal paneller kullanılabildiği gibi hem identifikasyon hem de epidemiyolojik araştırmalarda moleküler yöntemlerden pulsed field gel electrophoresis, multilocus sekans tiplendirme, randomize amplifiye polimorfik DNA analizi, gen sekans analizi ve amplifiye fragman length polimorfizm (AFLP) gibi teknikler de kullanılmaktadır (Nourse ve ark., 1998; Mascini ve ark., 2006).

Geçmişten günümüze birçok toplumu etkileyen en önemli problemlerden biri de infeksiyöz hastalıklar olmuştur. Bu hastalıklarla mücadelede eski çağlardan beri çok

çeşitli organik ve inorganik maddeler kullanılmıştır. 1929 yılında Sir Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfi, infeksiyöz hastalık etkenleriyle mücadelenin stratejisini değiştirmekle beraber antibiyotik çağını da başlatmıştır. Devam eden yıllarda da Nobel ödülleri aldırarak kadar değerli doğal, sentetik ve semisentetik antimikrobiyel ajanlar keşfedilerek infeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Tedavi süreci kontrolsüz ve düzensiz olduğundan keşfedilen her antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç gelişmiş ve yeni antibiyotik keşfini gündeme getirmiştir (Spelman, 2002; Danielle ve ark., 2005; Singh ve ark., 2006).

Enterokok türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda en sık izole edilen tür olan *E. faecalis*'in genellikle antibiyotiklere duyarlı ve *E. faecium*'un ise dirençli olması dikkati çekmektedir. Bu nedenle tür ayrımı tedavinin planlanması aşamasında önemli bir yer tutmaktadır (Patterson ve ark., 1995; Hoşgör ve ark., 1997; Ünlü ve ark., 2002).

Enterokokların neden olduğu sistemik hastalıkların tedavisinde genellikle beta-laktam, glikopeptid ve aminoglikozid grubu antibiyotikler kombine olarak kullanılmaktadır. Ancak, etkenlerin zaman içerisinde özellikle aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direnç kazandıkları, tedavide bu grup antibiyotiklerin başarısız olduğu belirlenmiştir. Ayrıca birçok antibiyotik türü yanında penisilin, sefalosporin ve beta-laktam grubu antibiyotiklere de doğal dirençli oldukları, florokinolon ve aminoglikozidlere karşı ise sonradan direnç kazandıkları bildirilmiştir (Gordon ve ark., 1992; Shepard ve Gilmore, 2002; Ünlü ve ark., 2002).

Enterokok türleri antimikrobiyel direnci kodlayan genler açısından önemli bir rezervuardır. Kolaylıkla antibiyotik direnci kazandıkları ve bu dirençlilik genlerini *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus* spp. ve *Streptococcus* spp. gibi diğer türlere de konjugasyon yoluyla aktardıkları belirlenmiştir (Rodrigues ve ark., 2002; Shepard ve Gilmore, 2002).

Enterokokların bilinen biyokimyasal özellik profillerine rağmen birçok saha suşunun biyokimyasal özelliklerinde varyasyonlar görülebilmektedir. Bu varyasyonlar identifikasyonlarda problem oluşturmakta ve yanlış identifikasyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle moleküler yöntemlerle identifiye edilen suşların biyotip

profillerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Bu araştırmada *E. faecalis* ve *E. faecalis* suşlarının biyotip profillerinin ortaya konulması amaçlanmış olup elde edilen sonuçların biyokimyasal identifikasyon işlemlerinde önemli bir kaynak olabileceği düşünölmektedir.

Öte yandan antibiyotiklere dirençlilik problemleri gün geçtikçe daha da artmaktadır. Bu çalışmada insanlardan alınan idrar ve gaita örneklerinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecalis* suşlarının çeşitli antibiyotiklere *in vitro* duyarlılıkları disk diffüzyon yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen sonuçların, söz konusu etkenlerden ileri gelen hastalıklarda tedavi protokollerinde kullanılmak üzere kaynak teşkil edebileceği ve geline direnç noktaları hakkında bir fikir verebileceği düşünölmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterokoklar ve Genel Özellikleri

2.1.1. Enterokokların sınıflandırılması

Enterokok cinsine ait mikroorganizmalar ilk olarak streptokoklar içerisinde “fokal orijinli streptokoklar” olarak gruplandırılmıştır. Enterokok terimi, ilk kez Thiercelin (1899) tarafından Fransa’da yayımlanan bir makalede “insan gaitasında kısa zincirler veya çiftler halinde görülen bakterileri” tanımlamak için kullanılmıştır (Facklam ve Teixeira, 1998). Birkaç yıl sonra Alexander Gordon, muhtemelen hayvan gaitası ile havadan kontamine olmuş sıvı besiyerinde fokal streptokok izole ettiğini bildirmiş ve S. Houston lağım suyunda bol miktarda streptokok bulunduğunu bildirmiş ve suların insan gaitası ile kontaminasyonunu göstermede yararlı olabileceğini ileri sürmüştür. *Streptococcus faecalis* tür ismi de ilk olarak Andrews ve Horder (1906) tarafından, mannitolü ve laktozu fermente eden ancak rafinozu fermente etmeyen ve sütün kesilmesine yol açan gaita kökenli organizmaları tanımlamak için kullanılmıştır (Andrews ve Horder, 1906; Facklam ve Teixeira, 1998).

Enterokoklar, Gram pozitif koklar grubunda olup son zamanlara kadar streptokok cinsi içinde sınıflandırılmışlardır. *S. faecalis* 1906 yılında Andrewes ve Horder tarafından, *S. faecium* ise 1919 yılında Orla-Jensen tarafından tanımlanmıştır. Sherman, 1937 ve 1938 yıllarında, pH 9.6’da, 10-45°C arasındaki sıcaklıklarda ve %6.5 NaCl içeren sıvı besiyerinde üreyebilen ve 60°C’de yarım saat canlılığını sürdürebilen streptokoklar için “Enterococcal grup” terimini kullanmıştır (Graham ve Bartley, 1939). Kalina (1970) enterokokal streptokoklar için bir cins oluşturulmasını ve hücresel dizilim ve fenotipik özelliklerine göre *S. faecalis* ve *S. faecium*’un *Enterococcus* olarak isimlendirilmesini önermiştir. Gram pozitif kokların DNA-RNA hibridizasyonları, 16S-rRNA sıralarının analizi ve hücre duvar yapılarının incelenmesi yöntemleri ile yapılan sınıflandırma çalışmaları sonucu; 1991’de Bentley ve arkadaşları, daha sonra da Kawamuro ve arkadaşlarının modifiye ettiği şekliyle *Streptococcaceae* familyası Gram pozitif koklar, *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* cinsi olarak ayrılmıştır.

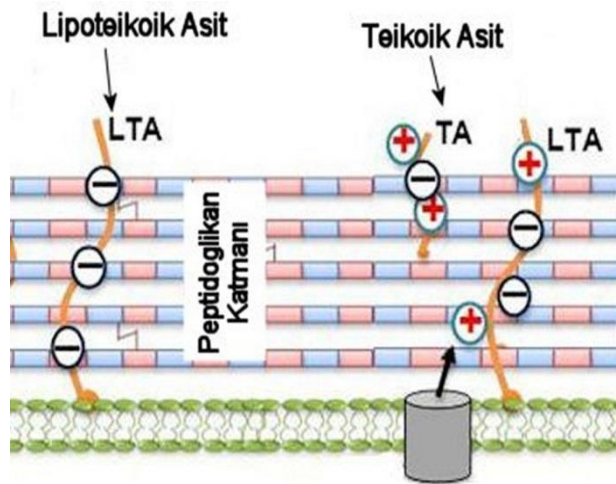
Moleküler genetik çalışmalarda elde edilen gelişmeler sonucunda da, günümüzde taksonomik olarak son sınıflandırılmaya göre *Enterococcus* cinsinde en az 36 farklı tür tanımlanmış ve insanlarda infeksiyon oluşturan tür sayısı da 26'yı bulmuştur (Anonim 1).

Enterokokların identifikasyonu için çeşitli testler yapılmaktadır. Enterokokların tiplendirilmesinde biyokimyasal testler, API sistemleri ve total plazmid içeriği kullanılmaktadır (Murray, 1990; Facklam ve Washington, 1991).

2.1.2. Enterokokların morfolojik, kimyasal ve antijenik yapıları

Enterokoklar tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde görülen, fakültatif anaerob, Gram pozitif koklardır. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayırt edilemezler. Bazen Gram pozitif kokobasil şeklinde görülebilirler. Sıvı besiyerlerinde bulanıklık yapmaksızın dipte çöküntü oluşturarak ürerler. Katalaz negatiftir, fakat bazı türlerde 'pseudo catalase' yapımı vardır (Ruoff ve ark., 1990).

Enterokokların hücre duvarı streptokoklarla çok benzer yapıda olup C-polisakkarit, peptidoglikan, teikoik asit ve lipoteikoik asitten oluşmaktadır. Peptidoglikan katmanı hücre duvarının %40'ını oluştururken, geri kalan kısmı da ribitol teikoik asit ve ramnozdan ibarettir (Facklam ve Teixeira, 1998).



Şekil 1. Enterokokların hücre duvarı kompozisyonu (Anonim 2)

Streptokoklarda Lancefield tarafından yapılan serotiplendirmede grup spesifik C-polisakkarit yapı ön planda yer alırken, serogrup D ile reaksiyon veren enterokoklarda ise yüksek oranda glukoz içeren poligliserolfosfatın bir teikoik asit polimeri olan lipoteikoik asitler belirleyici olmaktadır. Öte yandan *S. bovis*, *Leuconostoc* spp, *Pediococcus* spp ve *Vagococcus* spp'ler de serogrup D ile kros reaksiyon verebilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009).

2.1.3. Enterokokların virulens ve patojenite faktörleri

Enterokoklar düşük virulensli mikroorganizmalar olmalarına karşın toplum kaynaklı ve özellikle hastane kaynaklı infeksiyonlarda önemli etkenlerdir. *E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşları tarafından üretilen sitolizin, insan ve hayvan eritrositleri için hemolizin aktivitesi göstermektedirler (Moellering, 2005; Yıldırım, 2007).

En sık infeksiyon etkeni olan türlerden *E. faecalis* klinik örneklerden izole edilen enterokokların %85-95'ini, *E. faecium* ise %5-10'unu oluşturmaktadır (Zouain ve Araj, 2001).

E. faecalis ve *E. faecium* türleri, sentezledikleri agregasyon substansı aracılığıyla kalp kapakçıkları ve renal epitel hücrelerine yapışabilme özelliklerinden dolayı, endokardit ve üriner sistem infeksiyonlarına neden olmaktadır. Agregasyon substansı plazmidle kodlanan bir protein olup, mikroorganizmanın kümeleşmesine neden olmakta ve bu durum konjugatif plazmid aktarımının artmasına katkı sağlamaktadır. Yapılan deneysel endokardit infeksiyonlarında; kardiyak vejetasyonlara ve renal-intestinal epitele tutunmada da agregasyon substansının önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Koneman ve ark., 1997; Murray, 1998; Moellering, 2000).

E. faecalis'te görülen biyofilm oluşumu bu etkenin üriner sisteme, vasküler kateterlere ve kalp kapaklarına kolonize olmasını kolaylaştırmaktadır (Moellering, 2005).

Enterokokların sentezlediği feromonlar küçük peptidler olup, suşlar arasında plazmid DNA'sının konjugasyonunu kontrol etmektedirler. Ayrıca nötrofillere pozitif kemotaksis etkili oldukları sanılmaktadır (Koneman ve ark., 1997; Murray, 1998; Moellering, 2000).

Lipoteikoik asit, grup D ve enterokokların yapısal antijeni olup immun yanıtın düzenlenmesinde aktif rol oynayan tümör nekrozis faktör (TNF) ve interferon (IFN) sentezini uyardığından bakterinin virulensinde de rol oynar. Bazı *E. faecalis* suşları tarafından salınan litik aktiveteye sahip bir bakteriyosin olup AS-48 plazmidle kodlanmaktadır. Ayrıca bazı *E. faecalis* suşları da jelatinaz ve hyaluronidaz gibi değişik ekstrasellüler enzimlere de sahiptir (Koneman, 1997).

E. faecalis ve bazı *E. faecium* suşları tarafından sentezlenen ve insan, tavşan, sığır ve at eritrositlerini lize eden plazmid aracılı hemolizinlerin virulenste önemli rolü bulunmaktadır. Ayrıca bu hemolizinlerin deneysel infeksiyonlarda letalite ve toksisiteyi arttırdığı ve nozokomiyal bakteriyemi sonrası ani ölüm riskini 5 kat arttırdığı gösterilmiştir (Koneman ve ark., 1997; Huycke ve ark., 1998; Murray, 1998; Moellering, 2000).

Enterokokların diğer virulens faktörleri arasında sitolizin, jelatinaz, yüzey proteinleri, adhezyon molekülleri, kapsül, süperoksitler, hyaluronidaz ve antibiyotik direnci yer almaktadır (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Devriese, 2006; Upadhyaya ve ark., 2009).

2.1.4. Enterokokların epidemiyolojik özellikleri

Enterokoklar, toprak, su, yiyeceklerde; insan ve hayvanların barsak, safra yolları, ağız ve bazen de derilerinde (özellikle perineal deri) normal florada bulunurlar. Uygun koşullarda insanlarda çeşitli infeksiyonlara yol açarlar. Klinik olarak diğer streptokokların duyarlı olduğu antimikrobiyellere karşı dirençli olmaları nedeniyle, özellikle nozokomiyal patojen olarak klinik önemleri giderek artmaktadır. (Unat, 1986; Koneman ve ark., 1997; Moellering, 2000).

Enterokoklar sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sisteminde, ayrıca böceklerde, bitkilerde dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde de bulunur. Bu sebeple içme ve kullanma sularındaki fekal kontaminasyonlarda indikatör mikroorganizma olarak kullanılırlar. İnsan dışkısında *E. faecalis* (10^5 - 10^7 cfu/gr), *E. faecium*'dan (10^4 - 10^5 cfu/gr) daha yaygın bulunur, fakat özellikle hastane ortamında

antibiyotiklere dirençliliğinden dolayı *E. faecium* daha baskındır (Fisher ve Phillips, 2009; Hijazi ve ark., 2009).

Enterokoklar vajina, deri, oral kavite ve dental plaklarda daha az sıklıkta bulunmaktadır. Bunların dışında laktik asit üretmelerinden dolayı peynir yapımında starter kültür olarak kullanılmakta, peynirler, et ürünleri ve diğer yiyeceklerden de izole edilebilmektedirler (Facklam ve Teixeira, 1998; Bilström, 2008; Hijazi ve ark., 2009).

İnsanlarda gastrointestinal kanalda yüksek düzeyde bulunan enterokoklar, genitoüriner sistem ve oral kavitede daha az sayıda normal flora etkeni olarak bulunmaktadır (Huycke ve ark., 1998). Sıklıkla intraabdominal infeksiyon, endokardit ve bakteriyemiye yol açarken, daha az olarak da menenjit, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına sebep olmaktadır. Bakteri, konakçı dışında değişen sıcaklık, pH ve hatta bazı bakterisidal etkili deterjanların varlığında dahi canlılığını koruyabilmektedir. Bakterinin özellikle nozokomiyal infeksiyonlarda önemi giderek artmakta, hatta bazı olgularda nozokomiyal bakteriyemilerden sorumlu tutulmaktadırlar (Lautenbach ve ark., 1999; Patterson, 2000; Shepard ve Gilmore, 2002).

2.1.5. Enterokokların klinik infeksiyonları

Enterokokal infeksiyonlar içerisinde *E. faecalis* ile oluşan infeksiyonların oranı diğer türlere göre 10 kat daha fazladır. Ancak son yıllarda, vankomisine dirençli enterokok (VRE)'lerin ortaya çıkması nedeniyle bu oran gittikçe düşmüş ve *E. faecium* izolatları ön plana çıkmaya başlamıştır. Bugün, Amerikan ulusal nozokomiyal infeksiyon çalışma sistemi sonuçlarına bakıldığında, ABD'de infeksiyon etkeni olarak izole edilen enterokoklar içerisinde VRE'lerin oranının %20'leri bulunduğu görülmektedir. Avrupa'da VRE'nin muhtemel rezervuarının hayvan çiftlikleri olduğu düşünülmektedir. ABD'de ise VRE kaynağı; hastane çalışanları ve hastaların elleri, steteskop, termometreler ve bunun gibi birden fazla hastada kullanılabilen tıbbi cihazlardır. ABD'de aşırı antibiyotik kullanımı Avrupa'da ise hayvanlarda büyümeyi artırıcı olarak kullanılan ve bir glikopeptid türevi olan avoparsin kullanımının vankomisin direncinin artmasına neden olduğu kabul edilmektedir (Baştasoglu ve ark., 2002).

Üriner sistem infeksiyonları enterokokların yol açtığı klinik hastalıkların en sık görülen tipidir ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen enterokokların en sık kaynağı da zaten idrar kültürleridir (Moellering, 2005). Enterokokların etken olduğu üriner sistem infeksiyonlarının çoğu nozokomiyal olup çoğunlukla üriner kateterizasyon ile birlikte bulunmaktadır. Özellikle yapısal bozukluğu veya tekrarlayan üriner sistem infeksiyonu olan hastalarda sık görülmektedir (Murray, 1998). Enterokoklar hastanede yatmayan genç ve sağlıklı bireylerde komplike olmamış sistit gibi üriner infeksiyonların %5'inden azını oluşturmaktadır (Söyletir ve Çerikçioğlu, 2002).

Enterokoklar bakteriyel endokarditlerin %5-15'ini oluştururlar (Moellering, 2005). Enterokok bakteriyemisi enterokok endokarditinden daha sık görülen bir infeksiyondur ve sıklığı giderek artmaktadır. Endokardit hastane dışı enterokok bakteriyemilerinin 1/3'ünde görülürken nozokomiyal bakteriyemilerde endokardit oranı %1'in altındadır (Murray, 1998).

Enterokoklar tüm infektif endokarditlerin %5-15'inden sorumludur. Çoğunun etkeni *E. faecalis*'tir. Ancak vakalardan *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosum* da izole edilmiştir. Enterokoklar hasarlı kalp kapaklarına tutunabildiği gibi normal kapakçıga da (özellikle sol kalp) tutunabilirler. Sıklıkla intraabdominal ve pelvik infeksiyonların aerop ve anaerop florası içindedirler. *Escherichia coli* ve *Bacteroides fragilis*'ten daha az sıklıkta gastrointestinal kaynaklı bakteriyemi yaparlar. Siroz veya nefrotik sendromlu hastalarda, spontan bakteriyel peritonitli ve periton diyalizi yapılanlarda da peritonite neden olmaktadır. Saf enterokokal peritonit bazen abdominal cerrahi veya travma komplikasyonu olabilir. Enterokoklar ayrıca endometrit, sectio veya akut salpingitis komplikasyonu olarak bakteriyemi ve apse yapabilirler. Tek başına enterokokal yara ve yumuşak doku infeksiyonu pek görülmez. Cerrahi yara, dekübit ülseri ve diyabetik ayak infeksiyonlarının miks etken üyesidirler. Kronik osteomyelitlilerde de görülebilir ancak, burada saptanması genellikle primer infeksiyonu göstermez, superinfeksiyonu gösterir. Enterokoklar nadiren menenjit yapmaktadır. Solunum yolu infeksiyonlarının sıklığı giderek artmaktadır. Önemli hastalığı, düşkünlüğü olan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan, enterik beslenen hastalarda nadiren pneumoni yapmaktadır (Unat, 1986; Bilgehan, 1995; Koneman ve ark., 1997; Moellering, 2000).

2.2. Enterokoklarda Antimikrobiyel Duyarlılık

Enterokoklar antibiyotiklere doğal / kromozomal ya da kazanılmış direnç gösterebilirler. Doğal direnç aminoglikozidlere (düşük düzeyde), özellikle beta laktam antibiyotiklere, kazanılmış direnç ise aminoglikozidlere (yüksek düzey) ve florokinolonlar gibi çeşitli antibiyotiklere karşı gelişebilmektedir. Aminoglikozidlere karşı doğal direnç düşük düzeyde görülür. Bu dirence rağmen aminoglikozidler etkili bir ajanla beraber kullanıldıklarında, hücre duvarına sinerjik etkileşim sonucu bakterisit etki sağlayabilmektedir. Yüksek düzey aminoglikozid direnci varlığında beta-laktam antibiyotiklerle sinerjik etkileşim söz konusu değildir (Çetinkaya ve ark., 2000).

Enterokok suşları ile oluşan infeksiyonların tedavisinde yaklaşım genellikle, beta-laktam ve aminoglikozid bir antibiyotiğin kombinasyonu, eğer bunlara direnç var ise glikopeptid antibiyotiğin seçilmesi gereklidir. Ancak suşların çoğu kez çoklu antibiyotik direncine sahip olması ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin varlığına ilaveten, giderek artan oranda bildirilen vankomisin direnci tedavide önemli bir sorun oluşturmaktadır (Çetinkaya, 2000; Shepard ve Gilmore, 2002).

Hastane infeksiyonu etkeni olarak izolasyon sıklığı giderek artan enterokoklarda çoklu ilaç direnci büyük bir sorun olmaktadır. Enterokok infeksiyonlarında beta-laktam, aminoglikozit ve glikopeptid antibiyotikler en çok kullanılan antibakteriyel ajanlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda Ersoy ve ark., (2005) penisilin direncini %25.9, Şirin ve Adıloglu, (2011) ise %28 bulmuşlardır. Bir başka çalışmada ise poliklinikten gönderilen örneklerde penisilin direnci %48, servisten gönderilen örneklerde ise %84 olarak saptanmıştır (Aguş ve ark., 2006). İdrar örneklerinden izole edilen enterokok suşlarıyla yapılan bir çalışmada penisiline %85 oranında direnç bildirilmiştir (Kalaycı ve ark., 2011). Hindistan'da pediatrik yoğun bakım hastalarına ait enterokok suşlarının penisilin direnci %100 olarak bulunmuştur (Kapoor ve ark., 2005).

Meriç ve ark., (2004) yaptıkları bir çalışmada *E. faecalis* suşlarında %21, *E. faecium* suşlarında ise %78 oranında siprofloksasine direnç saptamışlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise *E. faecalis* suşlarında %8, *E. faecium* suşlarında ise %62.5 oranında siprofloksasine direnç saptanırken (Berzeg ve ark., 2005), bir başka çalışmada *E.*

faecium suşlarında siprofloksasine %85.2, *E. faecalis* suşlarında %61 olmak üzere yüksek oranda direnç tespit edilmiştir (Türkdağı ve ark., 2011).

Yüksek düzey aminoglikozid direnci, penisilinler ya da glikopeptidler ile aminoglikozid kombinasyonunun sinerjik bakterisidal etkisinin ortadan kalkmasına yol açmaktadır. Bu nedenle enterokokların neden olduğu infeksiyonlarda aminoglikozid direncinin saptanması gereklidir. Meriç ve ark., (2004) yaptıkları araştırmada gentamisin direncini %20 olarak bildirirken, Gazi ve ark., (2004) bu direnci %22, Yavuz ve ark., (2006) %44.4 olarak bildirmişlerdir. Barisic ve Punda-Polic (2000), hastanede yatan hastalardan izole ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde, gentamisin direncini sırasıyla %37 ve %76 bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada izole edilen tüm enterokok suşlarının gentamisin direnci *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri için sırasıyla %18.5 ve %23.5 olarak bulunmuştur (Udo ve ark., 2003). Daha önce hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokoklarla yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde gentamisin direnci ise sırasıyla %26.4 ve %48.9 olarak bulunmuştur (Karadenizli ve Kolaylı, 2002). Aral ve ark., (2011) aynı türlerde bu oranları sırasıyla %16 ve %60 olarak bildirirken, Meriç ve ark., (2004) %13 ve %41, Mert-Dinç ve ark., (2009) %14 ve %52, Kaçmaz ve ark., (2003) ise %8 ve %1 olarak saptamışlardır.

Enterokoklarda 1980'li yıllarda beta-laktam antibiyotiklere ve aminoglikozidlere direncin ortaya çıkması üzerine vankomisin, uzun yıllar tek uygun antibiyotik olarak kullanılmıştır. 1987 yılında ilk kez Fransa ve İngiltere'de vankomisine dirençli *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının varlığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada kandan izole edilen *E. faecalis*'te bu oran %1, *E. faecium*'da ise %4 olarak bildirilmiş (Gülay, 2008), başka bir çalışma da *E. faecium* suşlarında vankomisin direnç oranı %16.1, *E. faecalis* suşlarında ise bu direnç %3 olarak bulunmuştur. Vankomisine dirençli suşların MİK değerleri >256 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Türkdağı ve ark., 2011).

Tetrasiklin ve rifampisin, günümüze dek enterokok infeksiyonlarının sağaltımında yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak, bu ilaçların terapötik etkinliklerini saptamak güçtür. Çünkü bu iki ajan genellikle antibiyotiklerle birlikte kullanılırlar. Enterokoklarda rifampisin ve tetrasikline karşı yüksek oranlarda direnç saptandığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Loza ve ark., 1992; Pesce ve ark., 1992).

Enterokokların makrolid antibiyotiklere karşı direnç oranlarının oldukça yüksek düzeylerde olduğu (%40-100) bilinmektedir (Ulusoy ve ark., 1995; Aral ve ark., 2011). Aral ve ark., (2011) 158 enterokok suşunun antibiyotik duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında eritromisin direncini *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları için sırasıyla %56 ve %100 oranlarında bildirilmektedir. Yapılan başka bir çalışma da hem poliklinik hem de yatan hastalarda eritromisin direnci yüksek oranlarda (%75-85) tespit edilmiş ve *E. faecalis* suşlarına göre (%48) *E. faecium* suşlarında (%95) anlamlı olarak daha yüksek düzeyde gözlenmiştir (Özseven ve ark., 2011).

Enterokok infeksiyonlarının tedavisi, hem bu mikroorganizmaların klasik antibiyotiklere dirençli olduklarından, hem de laboratuvarlarda gerçek ve doğru duyarlılıklarının saptanması için spesifik yöntemlere ihtiyaç duyulmasından dolayı çeşitli güçlükleri barındırmaktadır. Standart duyarlılık testleriyle penisilin-aminoglikozid sinerjisi, beta laktamaz üreten suşların penisilin ve ampicilin direnci tahmin edilememektedir. Bu nedenle laboratuvarların aminoglikozid ve beta laktamaz varlığı açısından etkeni test etmeleri önerilmektedir. Penisilin gibi enterokoklara bakteriyostatik etkili antibiyotikler, bakterisid tedavinin gerekmediği üriner infeksiyon, peritonit ve yumuşak doku infeksiyonlarının tedavisinde ilk seçilecek ajanlar olmaya devam etmektedir. Glikopeptidler, penisilin alerjisi varlığında veya *E. faecium* gibi yüksek düzeyde penisilin alerjisi varlığında veya *E. faecium* gibi yüksek düzeyde penisilin direnci olan suşlarda tercih edilmektedir (Berzeg, 2005)

Siprofloksasin ve ofloksasin gibi kinolonlar, enterokoklara *in vitro* etkili olup bazı üriner infeksiyonlarda kullanılırsa da genelde etkilerine güvenilmez ve sistemik infeksiyonlarda ilk tercih edilecek ajanlar değildirler. Siprofloksasin, direnci de giderek artmaktadır (Moellering, 2000; Murray, 2000). Siprofloksasin *in vitro* olarak enterokoklara karşı aktif bir ajan olmasına rağmen, bakterisidal etkisinin olmaması nedeniyle bu bakterinin sebep olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanımı sınırlıdır. Özseven ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada klinik ve poliklinik hastalarında tespit ettiği siprofiloksasin direncini *E. faecalis*'te %72 ve *E. faecium*'da ise %92 olarak bulmuştur. Bu direnç Türkiye'de bildirilen kinolon dirençlerinden (%22-72) oldukça yüksektir (Gazi ve ark., 2004; Yavuz ve ark., 2006; Aral ve ark., 2011). Aral ve ark., (2011) siprofloksasin direncini *E. faecalis* için %27 ve *E. faecium* için ise %69 olarak

tespit emişlerdir. Gazi ve ark., (2004) ise bu dirençleri sırasıyla %44 ve %39 olarak daha düşük düzeylerde bulmuşlardır.

Enterokoklarda birçok antimikrobiyal ajana karşı intrinsik ve kazanılmış tipte direnç gözlenmesi bu bakterilerin yol açtığı infeksiyonların tedavisinde önemli sorunlara neden olmaktadır. Penisilinlere, sefalosporinlere, klindamisine ve düşük düzeyde aminoglikozidlere karşı gözlenen intrinsik direncin varlığı sinerjik kombine antibiyotik tedavisini zorunlu kılmaktadır. Aminoglikozidlerin hücre zarından geçişlerindeki zorluk, düşük düzeyde aminoglikozid direncine neden olmaktadır. Bu nedenle, sinerjik etki oluşturmak amacıyla hücre duvarı sentezini inhibe eden bir antibiyotikle aminoglikozid grubu antibiyotiğin kombine kullanımı, tedavide başarı oranını arttırmaktadır. Ancak plazmid ve transpozonlar aracılığı ile kazanılmış direnç gelişimi nedeniyle yüksek düzey aminoglikozid direncinin ortaya çıkışı tedavide aminoglikozidler ile kombine olarak hücre duvarı sentezini inhibe eden ajanların kullanılması ile elde edilen sinerjik etkiyi de ortadan kaldırmaktadır (Shepard ve ark., 2002).

2.2.1. Araştırmada kullanılan antimikrobiyel maddeler ve etki mekanizmaları

Antimikrobiyel ajanlar mikroorganizmalardan elde edilen, küçük dozlarda diğer mikroorganizmaları öldüren veya üremeyi durdurucu etki gösteren ve memeli organizmasına zarar vermeyen doğal veya sentezlenmiş maddelerdir. Genel olarak kimyasal yapıları belli olan ve yapay olarak elde edilen maddelere kemoterapötik, doğal kaynaklı olanlara ise antibiyotik denilse de, günümüzde antimikrobiyel maddelerin sentetik veya yarı sentetik yöntemlerle elde edilmesi mümkün olduğundan, antibiyotik deyimi tedavide geçerli olan kemoterapötik ve antimikrobiyel maddeler için genel bir isim olarak kullanılmaktadır. Bir antimikrobiyel maddede bulunması gereken en önemli özellik, konağa zarar vermeden (seçici toksik etki) mikroorganizmaların çoğalmasının inhibe edilmesidir (Albay, 1998).

Bakteri hücrelerinde antibiyotiklerin etki ettiği farklı dört ana bölge vardır. Bunlar; hücre duvarı, hücre membranı, ribozom ve nükleik asittir. Antimikrobiyel

maddelerin etki mekanizması da temel olarak bu bölgelere yöneliktir ve dört türlü etki mekanizması olduğu kabul edilmektedir (Ustaçelebi ve ark., 1999).

Hücre duvarı sentezini inhibe eden antimikrobiyel maddeler peptidoglikanın polisakkarid zincirlerinin kros bağlanmasında rolü olan transpeptidasyon enzimlerini inhibe ederek bakterinin üremesini durdurur ve hücreyi nötralize edip eriterek, fagosite edilebilir hale getirir. Ancak bu gruptaki antimikrobiyel maddelerin etki gösterebilmeleri için bakterilerin üreme döneminde olmaları gerekir. Hücre duvarını etkileyen antibiyotikler mikroorganizmalar önceden sentezlenmiş hücre duvarını inhibe edemezler. Bu grupta kullanılan antimikrobiyel maddeler dört alt gruba ayrılırlar: beta-laktam antimikrobiyel maddeler (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta-laktamaz inhibitörleri), glikopeptid antimikrobiyel maddeler (vankomisin ve teikoplanin), sikloserin ve basitrasin (Ustaçelebi ve ark., 1999; Arda, 2006).

Penisilinler (penisilin, ampisilin, azlosin, mezlosilin, piperasilin, karbenisilin, tikarsilin, dikloksasilin, klolsasilin, metisilin, nafsilin, oksasilin ve mesilinam), bakteri hücre duvarında transpeptidasyonu engelleyerek peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Hücre duvarında penisilin bağlayan proteinler (PBP) reseptörlerine bağlanırlar ve penisilinin etkisi ile bakteri hücrelerinde peptidoglikan hidrolaz denen otolitik enzimlerin de aktive olmasıyla peptidoglikanı parçalarlar. Bakterilere çoğalma döneminde etki gösterirler. Penisilin G'nin beta-laktamazlarla inaktivasyonu; yan zincirlere metil veya etil grupları içeren büyük aromatik halkaların eklenmesi (metisilin, nafsilin, oksasilin) ile önlemiştir. Gram pozitif bakterilerin çoğuna, bazı Gram negatif bakterilere ve anaerobik bakterilere karşı etkili olup hücre duvarı olmayan mikoplazmalara karşı etkili değildirler (Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013).

β -laktam/ β -laktamaz inhibitör kombinasyonları (amoksisilin+klavulanik asit, ampisilin/sulbaktam, pioerasilin/tazobaktam, tikarsilin/klavulanik asit), penisilin ve sefalosporinler ile sinerjik β -laktamazları inhibe etmektedir (Ustaçelebi ve ark., 1999).

Glikopeptidler (oritavansin, vankomisin, dalbavansin, teikoplanin ve telavansin), peptidoglikan molekülünün peptid formasyonuna engel olur ve Gram pozitif bakterilere

karşı etki etmektedir. Metisilin dirençli *S. aureus* ve koagulaz negatif stafilokokların yol açtığı infeksiyonların tedavisinde ilk seçilecek antimikrobiyel maddelerdendir (Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; CLSI, 2013).

Protein sentezini inhibe eden antimikrobiyel maddelerin (aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler ve linkozamidler) çoğu, bakterilerde protein sentezini inhibe ederken diğer canlılarda selektif toksisite göstermekte ve etkisiz kalmaktadır. Bu selektivite, bakterilerdeki ribozomal proteinlerle RNA'nın ve ilgili enzimlerin diğer canlılardan farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bakteriler 50S ve 30S ribozomal alt üniteleri olan 70S ribozoma sahiptirler. Memeli hücrelerinin mitokondrialarında protein sentezinden sorumlu olan mitokondrial ribozomlar (55S) bakterilerdeki gibidir, dolayısıyla mitokondrionlara girerek (kloramfenikol) protein sentezini inhibe edebilirler. Bu gruptaki antimikrobiyel maddeler; 30S ribozomal alt üniteye etkili olanlar (aminoglikozidler ve tetrasiklinler) ve 50S ribozomal alt üniteye etkili olanlar (kloramfenikol, makrolidler, ve linkozamidler) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Kaya, 1997; Ustaçelebi ve ark., 1999; Arda, 2006).

Makrolidler (azitromisin, diritromisin, eritromisin ve klaritromisin), bakteriyel RNA'ya bağımlı protein sentezini inhibe eden genellikle bakteriyostatik etkili antimikrobiyel maddelerdir. Protein sentezine 50S ribozomal alt ünite düzeyinde engel olmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, *Mycoplasma* spp, *Chlamydia* spp, *Treponema* ve *Rickettsia* spp türlerine etkilidir (Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013).

Tetrasiklinler (doksisisiklin, minoksiklin ve tetrasiklin), genellikle bakteriyostatik etkiye sahiptirler. Bakteri hücresinin içine girdikten sonra, 30S ribozomal alt üniteye geri dönüşümlü olarak bağlanarak tRNA'nın ribozoma bağlanmasını önlemekte ve sonuçta protein sentezi inhibe etmektedir. Geniş spektrumlu olduğundan Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere, riketsiya, klamidy, mikoplazma ve diğer antimikrobiyel maddelere direnç gösteren bakterilere karşı inhibitör etkiye sahiptirler. Hem bakteri hem de konakçı hücre dizilerinde protein sentezini inhibe ederler. Seçici etkisi ribozomal düzeyde olmayıp, duyarlı bakteri hücrelerine konakçı hücrelerinden daha fazla girmesine bağlıdır (Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013).

Nükleik asit sentezinin bozulması 4 tarzda olabilir. Bunlar DNA'nın çift sarmal yapısının bozulması, DNA replikasyonunda görev alan DNA polimeraz ve transkripsiyonda rol alan RNA polimeraz enzimlerinin görevlerinde bozuklukların oluşması, nükleik asit sentezine mani olunması veya antimikrobiyel maddelerin nükleik asit yerine girmeleri sonucu DNA yapısında ve fonksiyonlarında bozuklukların oluşmasıdır. Bu grupta etki gösteren antimikrobiyel maddeler 3 gruba ayrılırlar: Bunlar Prekürsör sentezini inhibe edenler (sulfonamidler ve trimetoprim), DNA sentezini inhibe edenler (kinolonlar) ve RNA sentezini inhibe edenler (rifampisin). Diğer yandan, bakteri hücre duvarında müreinin sentezini engelleyen novobiosin, DNA polimerazı etkileyip DNA kalıbının çıkarılmasını engelleyerek de etki göstermektedir (Kaya, 1997; Arda, 2006).

Kinolonlar (garenoksasin, nalidiksik asit, sinoksasin, enoksasin, fleroksasin, gatifloksasin, gemifloksasin, grepakfloksasin, klinafloksasin, levofloksasin, lomefloksasin, moksifloksasin, norfloksasin, ofloksasin, siprofloksasin, enrofloksasin, sparfloksasin ve trovafloksasin), bakterilerde DNA'nın süper sarmal oluşturabilmesi için gerekli olan DNA giraz enzimini inhibe ederler. Gram negatif basillere, Gram negatif koklara, *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklara karşı etkili olup, streptokok ve enterokoklara karşı etkilerinin daha az olduğu ifade edilmektedir (Kaya, 1997; Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013). Penisilinler gibi bakteri hücre duvarı sentezini engelleyerek veya kinolonlar gibi DNA girazı inhibe ederek bakterilerde bakterisidal etki gösterebilirler. Penisilin dirençli bakterilere, stafilokoklara ve Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (Watts ve Salmon, 1995; Kaya, 1997; Arda, 2006).

Karbapenemler güçlü indükleyiciler olup enzim hidrolizine de dayanıklıdırlar ve hem indüklenebilir hem de stabil organizmalara karşı etkilidirler (Akata, 1997). Karbapenem sınıfı antibiyotikler, karbapenemleri hidrolize eden enzimler dışında, genel olarak β -laktamazlarca parçalanmaya dayanıklıdır. Doripenem, AmpC β -laktamazlar ve genişlemiş spektrumlu β -laktamazlarca (ESBL) parçalanmaya karşı yüksek bir dayanıklılık gösterir. Gerek AmpC ve ESBL oluşturan, gerekse yabancı tipteki (ESBL oluşturmayan) *Enterobacteriaceae* suşlarına karşı etkinliği, meropeneminkine benzemektedir. Doripenemin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı *in vitro*

antimikrobik etkinlik spektrumu imipenem ve meropeneminkine benzemektedir. Gram pozitif bakterilerden metisiline duyarlı *S. aureus* ve metisiline duyarlı koagulaz-negatif stafilokokların çeşitli suşlarına karşı en etkin karbapenemdir. Doripenem, *E. faecalis* suşlarına ve *E. faecium* dışı enterokok suşlarına karşı meropenem ve ertapenemden iki kat daha etkin, imipenemden ise iki kat daha az etkindir. Öte yandan vankomisine dirençli *E. faecium* suşlarının tümü doripeneme dirençlidir (Keam, 2008; Bazan ve ark., 2009; Sahm, 2009).

2.3. Enterokokların PCR İle Teşhisi

Enterokokların tür ve genotip tayininde PCR teknikleri başarı ile kullanım alanı bulmuştur. Yapılan araştırmalarda enterokoklardaki “elongasyon faktör” olarak ta adlandırılan *tuf* genini (*EF-Tu*) hedef alan primerler, bakteriyi cins düzeyinde identifiye ederken (Ke ve ark., 1999), D-alanin/ D-ligaz geni (*ddl*) (Dutka –Malen ve ark., 1995) ve *groESL* genini (Teng et al.) hedef alan primerler de bakterinin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır (Domig ve ark., 2003).

Entertokoklardaki 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 bakterilerin hem tür düzeyinde identifikasyonu hem de glikopeptid direncinin ortaya konulmasında; Miele ve ark., (1995) ise *van* genleri için bir primer setinin geliştirilmesinde, Klare ve ark., (1995) *vanA* ve *vanB* genlerini hedef alan yeni primerlerin geliştirilmesinde PCR tekniklerini kullanmışlardır (Domig ve ark., 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İdrar ve gaita örnekleri

Araştırmada, materyal olarak idrar yolu veya sindirim sistemi enfeksiyonu şüphesi ile Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesinin mikrobiyoloji laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen rutin idrar ve gaita örnekleri kullanıldı.

3.1.2. Bakteri izolatları

Çalışmada incelenen 177 idrar ve 90 gaita örneğinden izole edilen 40'ar adet *E. faecalis* ve *E. faecium* suşu test edildi.

3.1.3. Referans suşlar

Moleküler teşhiste, biyokimyasal testlerde ve antimikrobiyel duyarlılık testlerinde kalite kontrol amacıyla *E. faecalis* ATCC® 29212, *E. faecalis* ATCC® 51299 ve *E. faecium* ATCC® 19434 referans suşları kullanıldı. Referans suşlar, MicroBiologics, MediMark Europe/Fransa firmasından temin edildi.

3.1.4. Besiyerleri

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının izolasyonu, identifikasyonu, biyokimyasal özelliklerinin tespiti ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması amacıyla blood agar base (Oxoid, CM0055), tryptone soya agar (Oxoid, CM131), mueller hinton agar (Oxoid, CM0337), bile esculin agar (Oxoid, CM888), edwards medium (Oxoid, CM0027), brain heart infusion broth (Oxoid, CM225), phenol red broth base (Merck, 1.10987), SIM medium (Merck, 5470) ve Todd Hewitt broth (Difco BBL, 249240) besiyerleri kullanıldı.

3.1.5. Antimikrobiyel maddeler

E. faecalis ve *E. faecium* olarak identifiye edilen kültürlerin antimikrobiyel maddelere duyarlılığının Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi (Bauer ve ark, 1966) ile

tespiti amacıyla Penisilin-G (10 IU), Vankomisin (30 µg), İmipenem (10 µg), siprofloksasin (5 µg), rifampisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Tetrasiklin (30 µg), Eritromisin (15 µg), Klindamisin (2 µg) ve Trimethoprim/Sulfamethoksol (25 µg) diskleri (Oxoid) kullanıldı.

3.1.6. Çözeltiler ve test ortamları

Fizyolojik tuzlu su (FTS): 8.76 gr NaCl, distile su içinde çözdürülüp 1 lt'ye tamamlandı (Lenette ve ark., 1985).

Karbonhidrat solüsyonları (%10): 10 gr karbonhidrat (L-arabinoz, arbutin, galaktoz, D-glukoz, inulin, laktoz, mannitol, D-rafinoz, salisin, sorbitol ve trehaloz), 50 ml steril distile suda çözdürüldü ve karışım 100 ml'ye tamamlandıktan sonra 0.2 µm'lik membran filtreden (Sartorius Minisart) süzülerek kullanıldı (Carter, 1984; Lenette ve ark., 1985; Koneman ve ark., 1988).

Arjinin test ortamı: Bu test ortamı için besiyeri hazırlanırken, 1000 ml distile suda Tripton (5 gr), maya ekstraktı (2.5 gr), D-glukoz (0.5 gr), K₂HPO₄ (2.0 gr) ve L-arjinin monohidroklorid (3.0 gr) çözdürüldükten sonra, tüplere beşer ml dağıtıldı ve 121°C'de 15 dk sterilize edildi (Lenette ve ark., 1985).

Nessler ayıracı: Bu ayıraç için 7 gr KI ve 10 gr HgI, 40 ml distile suda iyice çözdürüldü. Ayrıca 10 gr KOH, 50 ml distile suda çözdürülüp soğumaya bırakıldı. Bu iki çözelti karıştırılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti, çökeltme oluşuncaya kadar bekletildi ve üstteki sıvı alınarak testte kullanıldı (Lenette ve ark., 1985; Koneman ve ark., 1988).

Kovaks ayıracı: Bunun için 75 ml amil alkol içinde 5 gr P-dimetil amino benzaldehid çözdürüldü ve üzerine yavaşça 25 ml saf HCl (%37) ilave edilerek hazırlandı (Lenette ve ark., 1985).

Mc Farland no:0.5 çözeltisi: 0.5 ml %1.75 BaCl₂, 2H₂O çözeltisiyle 99.5 ml %1'lik H₂SO₄ solüsyonunun karıştırılması ile elde edildi. Çözeltinin optik yoğunluğu 550 nm'de spektrofotometrik olarak 0.126 olarak belirlendi (Baron ve Finegold, 1990; Winn ve ark., 2006).

3.2. Yöntem

3.2.1. İdrar ve gaita örneklerinin alınması

Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yönetiminin izni-onayı doğrultusunda idrar yolu veya sindirim sistemi infeksiyonu şüphesi ile hastanenin mikrobiyoloji laboratuvarına getirilen örneklerden, hastaların onayı ile alınan 3-5 ml idrar ve gaita örneklerinden alınan svap sürüntüsü kapaklı steril tüplere konularak kısa sürede ve soğuk zincirde YYÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi.

3.2.2. Bakteriyel izolasyon

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının izolasyonu için iyice homojenize edilen idrar ve gaitadan steril svap yardımı ile alınan örneklerin kanlı agar, edwards medium ve bile esculin agara ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C’de 24-48 saat süreyle aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Üreyen gözle görülebilir S tipli eskulin pozitif kahverengi-siyah renkli koloniler değerlendirmeye alındı.

3.2.3. İdentifikasyon

Değerlendirmeye alınan kültürler Gram boyama yöntemi ile incelendi. Gram pozitif, tek tek, ikili veya zincir biçimindeki koklar enterokok şüpheli olarak ayrıldı (Winn ve ark., 2006).

3.2.3.1. Katalaz testi

Bunun için temiz bir lam üzerine 1 damla %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı ve tryptic soy agarda üretilen 24 saatlik taze kültürdeki şüpheli bir koloni öze ile alınıp, H₂O₂ ile temas ettirildi. Temas sonrası hava kabarcığının oluşması pozitif, oluşmaması negatif olarak kabul edildi. İncelenen izolatlardan bile esculin agarda üreyebilen Gram pozitif, eskulin pozitif ve katalaz negatif kültürler *Enterococcus* spp. şüpheli olarak ayrıldı (Carter, 1984; Koneman ve ark., 1988).

3.2.3.2. Enterokok izolatlarının PCR ile identifikasyonu

DNA izolasyonu: Testte pozitif kontrol amacıyla *E. faecalis* ATCC® 29212, *E. faecalis* ATCC® 51299 ve *E. faecium* ATCC® 19434 referans suşları kullanıldı. Pozitif kontroller ve enterokok şüpheli olarak ayrılan 24 saatlik bakteri kültürleri DNA izolasyon kiti (Thermo GeneJET Genomic DNA Purification Kit – K0722) kullanılarak üretici firmanın Gram pozitif bakteriler için önerdiği protokolde DNA izolasyonları yapıldı. Bu amaçla 24 saatlik enterokok kültürlerinden FTS içinde Mc Farland 0.5 yoğunluğundaki süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyondan 1 ml alınarak ependorf tüplerine aktarıldı ve 5.000 x g’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantı atıldı. Pelet üzerine 180 µl lysis buffer (Gram pozitif bakteriler için ayrı hazırlandı) eklenerek iyice karıştırıldı ve 37°C’de 30 dk bekletildi. Bakteri süspansiyonu üzerine kitte bulunan lysis solüsyondan 200 µl ve proteinase K solüsyonundan da 20 µl eklendi ve karıştırılarak homojenize edildi. Karışım ara sıra karıştırılarak çalkalandı ve su banyosunda 56 °C’de yaklaşık 30 dk bekletilerek hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Çözelti üzerine kitte bulunan RNAase A solüsyonundan 20 µl eklenerek, vortexlendi ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Üzerine 400 µl %50’lik etanol eklenerek iyice homojenize olması sağlandı. Karışımın tamamı içinde filtre bulunan koleksiyon tüplerine aktarılıp 6.000g’de 1 dk santrifüj edildikten sonra filtreler çıkarılarak yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Filtreli tüpün üzerine kitte bulunan ethanol ilave edilmiş Wash Buffer I’ den 500 µl eklenerek 8000g’de 1 dk santrifüj edildi ve filtreleri çıkarılarak tekrar yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Üzerine wash buffer II’den 500 µl eklenerek, 12.000g’de 3 dk santrifüj edildi ve filtreli tüpler steril ependorf tüplerine yerleştirildi. Filtreli tüplerin üzerine elution buffer’den filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 200 µl eklenerek oda ısısında 2 dk beklendi ve 8.000g’de 1 dk santrifüj edildi. Bu şekilde izole edilen DNA alt tüplere aktarıldığından filtreler çıkarılarak atıldı.

Primer dizaynı: Primerler 16S ve/veya 23S rRNA genlerini kodlayan DNA’nın spesifik bölgeleri baz alınarak GenBank veritabanı ile doğrulanıp dizayn edildi. Primer dizisi; *E. faecalis* için F: 5’ ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC 3’ ve R: 5’ TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG 3’; *E. faecium* için F: 5’ GAA AAA ACA ATA GAA GAA TTA T 3’ ve R: 5’ TGC TTT TTT GAA TTC TTC TTT A 3’; formülasyonunda

sentez ettirildi (Jackson ve ark., 2004). Multiplex PCR işlemleri, Kariyama ve ark., (2000) ile Jackson ve ark., (2004)'nın bildirdiği şekilde yapıldı.

Amplifikasyon: İzole edilen pozitif kontroller ve enterokok şüpheli DNA'ların *E. faecalis* ve *E. faecium* yönünden incelenmesi için tür spesifik primerler kullanılarak multiplex PCR tekniği uygulandı. Amplifikasyon aşaması için hazır ticari mastermixler (Thermo PCR Mastermix 2x – K0171) kullanıldı. Karışım hazırlanırken: 25 µl'lik bir mastermix içine 2 µl incelenen bakteri DNA'sı ve 1'er µM primerler konulup karışım PCR grade water ile 50 µl'ye tamamlandı. Mastermix ön denatürasyon için 96°C'de 10 dk bekletildi. Daha sonra toplam 35 siklus gerçekleştirilen aşamada: 95 °C'de 45 sn denatürasyon, 49 °C'de 45 sn bağlanma, 72 °C'de 60 sn uzama ve final uzama için de 72°C'de 10 sn'lik protokol uygulandı.

Agaroz jel elektroforez: Amplifikasyon aşamasının sonunda elde edilen ürünler pozitif kontroller ile birlikte %1'lik agaroz jelde koşturularak görüntüleme sisteminde (Genesis) incelendi. Oluşan bantlar değerlendirilirken örnekler arasında *E. faecalis* pozitif olan izolatların 360 bp, *E. faecium* pozitif olan izolatların ise 215 bp'lik bant oluşturup oluşturmadığı araştırıldı.

3.2.4. Biyotiplendirme

Moleküler tekniklerle *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak tanımlanmış izolatların biyotiplendirilmesi amacıyla aşağıda belirtilen biyokimyasal özellikleri incelendi.

3.2.4.1. %6.5 NaCl ortamında üreme

Bu amaçla, BHI brotha son konsantrasyonu %6.5 olacak şekilde NaCl ilave edildi ve tüplere beşer ml dağıtılarak 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Tüplere 24 saatlik enterokok kültürlerinin ekimi yapıldıktan sonra, 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Tüplerin dibinde çökelti veya karıştırma sonucu bulanıklığın oluşması pozitif, tüpün berrak kalması ise negatif olarak değerlendirildi (Koneman ve ark., 1988; Arda, 2006).

Tablo 1. İncelenen *Enterococcus* spp suşlarının biyokimyasal özellikleri (Monero ve Blanch, 1999)

Biyokimyasal Testler	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
%6.5 NaCl ortamında üreme	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+
Hippurat hidrolizi	d	d
Arjinin hidrolizi	+	+
H ₂ S	-	-
İndol	-	-
Hareket	-	-
L-arabinos	-	+
Arbutin	-	+
Galaktoz	+	+
D-Glukoz	+	v
Giliserol	+	d
İnulin	-	-
Laktoz	+	+
Mannitol	+	+
D-Rafinoz	-	d
Salisin	+	+
Sorbitol	+	-
Trehaloz	+	+

v: %26 – 74’ü pozitif; **d:** Referans suşlarda değişiklik olmaktadır

3.2.4.2. Hemoliz testi

E. faecalis ve *E. faecium* izolatlarının hemolitik özelliklerinin tespiti için %5 defibrine koyun kanlı agar kullanıldı. Test için, 24 saatlik taze kültürlerden besiyerinde tek koloni oluşacak şekilde çizme yöntemiyle ekimler yapıldı ve kültürler 37°C’de 18-24 saat süreyle inkübe edildi. Bu süre sonunda üreyen kolonilerin etrafında tam bir hemoliz alanı oluşması β - hemoliz, kolonilerin etrafında yeşillenme ile karakterize hafif hemolitik alanın oluşması α - hemoliz ve koloni etrafında hemoliz alanının görülmemesi

de γ - hemoliz (non hemolitik) olarak değerlendirildi (Lenette ve ark., 1985; Baron ve Finegold, 1990; Koneman ve ark., 1997).

3.2.4.3. Eskulin hidrolizi

Enterokokların eskulini hidrolize edip etmediklerini araştırmak için %5-7 defibrine koyun kanlı Edwards besiyeri kullanıldı. Besiyerine izolatların ekimi yapıldı. Koloni etrafında koyu kahverengi bir zon oluşumu pozitif, renk değişikliğinin görülmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (Carter, 1984; Koneman ve ark., 1988; Arda ve ark., 1997).

3.2.4.4. Arjinin hidrolizi

Test için arjinin test ortamı ve nessler ayırıcı kullanıldı. Bu amaçla 24 saatlik bakteri kültüründen arjinin test ortamına inokulasyonlar yapıldı ve 35-37°C'de 2-7 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüpler, vorteks ile iyice karıştırıldı ve tüplerin her birine 0.1 ml nessler ayırıcı damlatıldı. Aynı anda gözlenen ve test ortamında portakal sarısından kahverengiye kadar değişen renk değişikliğinde reaksiyon pozitif, renk değişiminin görülmemesinde ise reaksiyon negatif olarak değerlendirildi (Harrigan ve McCance, 1976).

3.2.4.5. Karbonhidrat fermentasyon testleri

Test ortamı için, phenol rot broth kullanıldı. Hazırlanan test ortamı, tüplere 4.5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Otoklavda steril edildikten sonra daha önce hazırlanan karbonhidrat çözeltilerinden (L-arabinoz, Arbutin, Galaktoz, D-Glukoz, İnulin, Laktoz, Mannitol, D-Rafinoz, Salisin, Sorbitol, Trehaloz) son konsantrasyonu %1 olacak şekilde 0.5'er ml ilave edildi. Test için, incelenecek enterokok suşlarından hazırlanan 24 saatlik taze kültürlerden bir öze dolusu bakteri kolonisi karbonhidrat içeren buyyona inoküle edildi. Buyyonların 37°C'de 24-96 saat süreyle inkübasyonundan sonra normalde kırmızı renkte olan besiyerinin sarı renge dönüşmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması ise negatif olarak değerlendirildi (Lenette ve ark., 1985; Koneman ve ark., 1988; Baron ve Finegold, 1990).

3.2.4.6. SIM besiyerinde üreme

Bunun için SIM besiyerine 24 saatlik bakteri kültüründen iğne uçlu öze ile dikey inokulasyonlar yapılarak besiyeri 35-37°C’de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda tüplerde bulanıklık oluşumu varsa hareket pozitif, renk kararması varsa H₂S pozitif, besiyerinin üzerine kovaks ayırıcından 0.5 ml döküldükten sonra ayırıcın renginin kiremit kırmızısı renge dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi (Lenette ve ark., 1985).

3.2.5. Antibiyotik duyarlılık testi

Bunun için Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi kullanıldı. Test için önce incelenecek enterokok suşlarının 24 saatlik kültürlerinden FTS içeren tüplerde Mc Farland no:0.5 yoğunluğunda süspansiyonlar hazırlandı. Dha sonra steril svaplar kullanılarak süspansiyonlardan mueller hilton ağara yayma yöntemi ile ekim yapıldı. Oda sıcaklığında 15-30 dk bekletildikten sonra besiyerinin üzerine her bir petri kutusuna 5 disk gelecek şekilde Penisilin-G (10 IU), Vankomisin (30 µg), İmipenem’e (10 µg), Siprofloksasin (5 µg), Rifampisin (30 µg), Gentamisin (10 µg), Tetrasiklin (30 µg), Eritromisin (15 µg), Klindamisin (2 µg) ve Trimethoprim / Sulfamethokzol (25 µg) diskleri yerleştirildi ve kültürler 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda disk etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı dijital kumpas ile ölçülerek değerlendirme yapıldı. Değerlendirme, CLSI M02-A11 (M100-S23-Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları, 2013) verilerine göre yapıldı (Bauer ve ark., 1966; Lenette ve ark., 1985; Koneman ve ark., 1988).

3.2.6. İstatistiksel analiz

Enterokok suşlarının incelenen karakterleri ile ilgili olarak elde edilen bulguların dendogram analizleri küme değişken yöntemi ile antibiyotik duyarlılık test sonuçları ise Z-oran testine göre Minitab (Demo Ver-16.0) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı (Bağırkan, 1993).

4. BULGULAR

4.1. Enterokok Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu

Alınan örneklerin kültürel incelemeleri değerlendirilirken, besi yerlerinde gözle görülebilir S tipli eskulin pozitif kahverengi-siyah renkli koloni oluşturan, Gram pozitif, tek tek, ikili veya zincir biçimindeki katalaz negatif koklar *Enterococcus* spp. olarak identifiye edildi (Tablo 2).

Tablo 2. İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen enterokoklar ve dağılımları

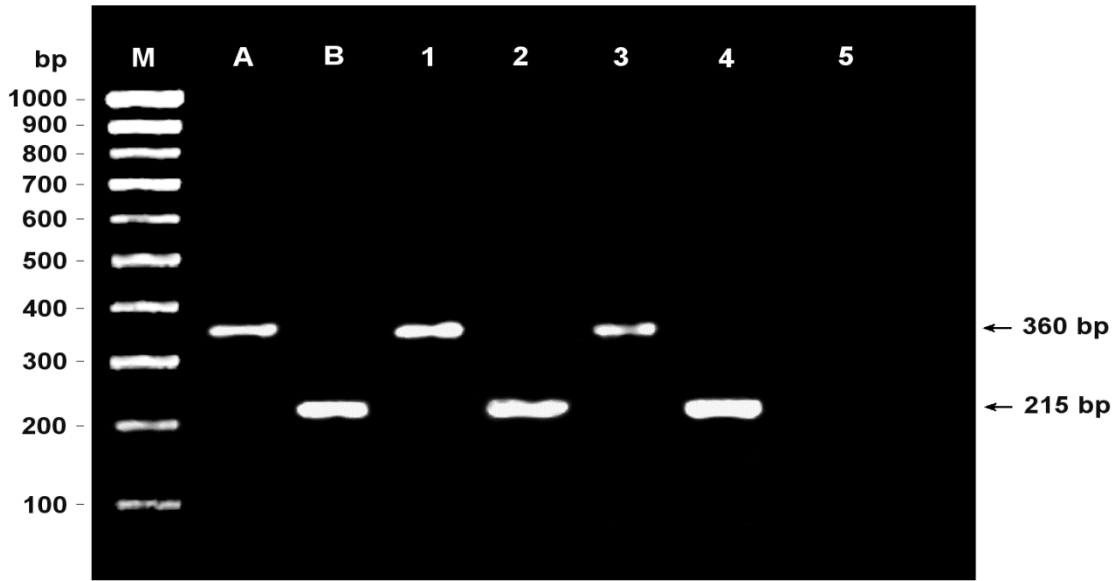
Örnekler	Alınan örnek sayısı	<i>Enterococcus</i> spp.		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
		n	%	n	%	n	%
İdrar	177	119	67.2	30	25.2	8	6.7
Gaita	90	68	75.5	10	14.7	32	47
Toplam	267	187	70	40	21.4	40	21.4

Araştırmada incelenen 177 idrar örneğinden 119 (%67.2) adet, 90 gaita örneğinden de 68 (%75.5) adet olmak üzere toplam 187 adet *Enterococcus* spp. izole ve identifiye edildi. İzolatların PCR tekniği ile tür spesifik primerler kullanılarak yapılan identifikasyonlarında, idrar orijinli enterokok suşlarının 30 (%25.2)'u *E. faecalis*, 8 (%6.7)'i de *E. faecium* olarak identifiye edilirken; gaita orijinli izolatların da 10 (%14.7)'u *E. faecalis*, 32 (%47)'si ise *E. faecium* olarak identifiye edildi (Tablo 2, Şekil 2).

4.2. Enterokok Suşlarının Biyotiplendirilmesi

E. faecalis ve *E. faecium* izolatlarının biyotiplendirilmesi amacıyla bazı biyokimyasal analizler yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 3'te sunuldu.

Hemoliz testinde *E. faecalis* izolatlarının 18 (%45)'i β -, 22 (%55)'si γ - hemolitik olarak tespit edilirken, *E. faecium* izolatlarının 8 (%20)'i β -, 2 (%5)'si α - ve 30 (%75)'u ise γ -hemolitik olarak tespit edildi.



Şekil 2. Enterokokların mltipleks PCR yöntemi ile analizlerinin agaroz jel görüntüsü (M: PCR ranger 100 bp DNA marker; A: *E. faecalis* pozitif kontrol; B: *E. faecium* pozitif kontrol; 1: *E. faecalis* pozitif gaita örneği; 2: *E. faecium* pozitif gaita örneği; 3: *E. faecalis* pozitif idrar örneği; 4: *E. faecium* pozitif idrar örneği; 5: Negatif kontrol)

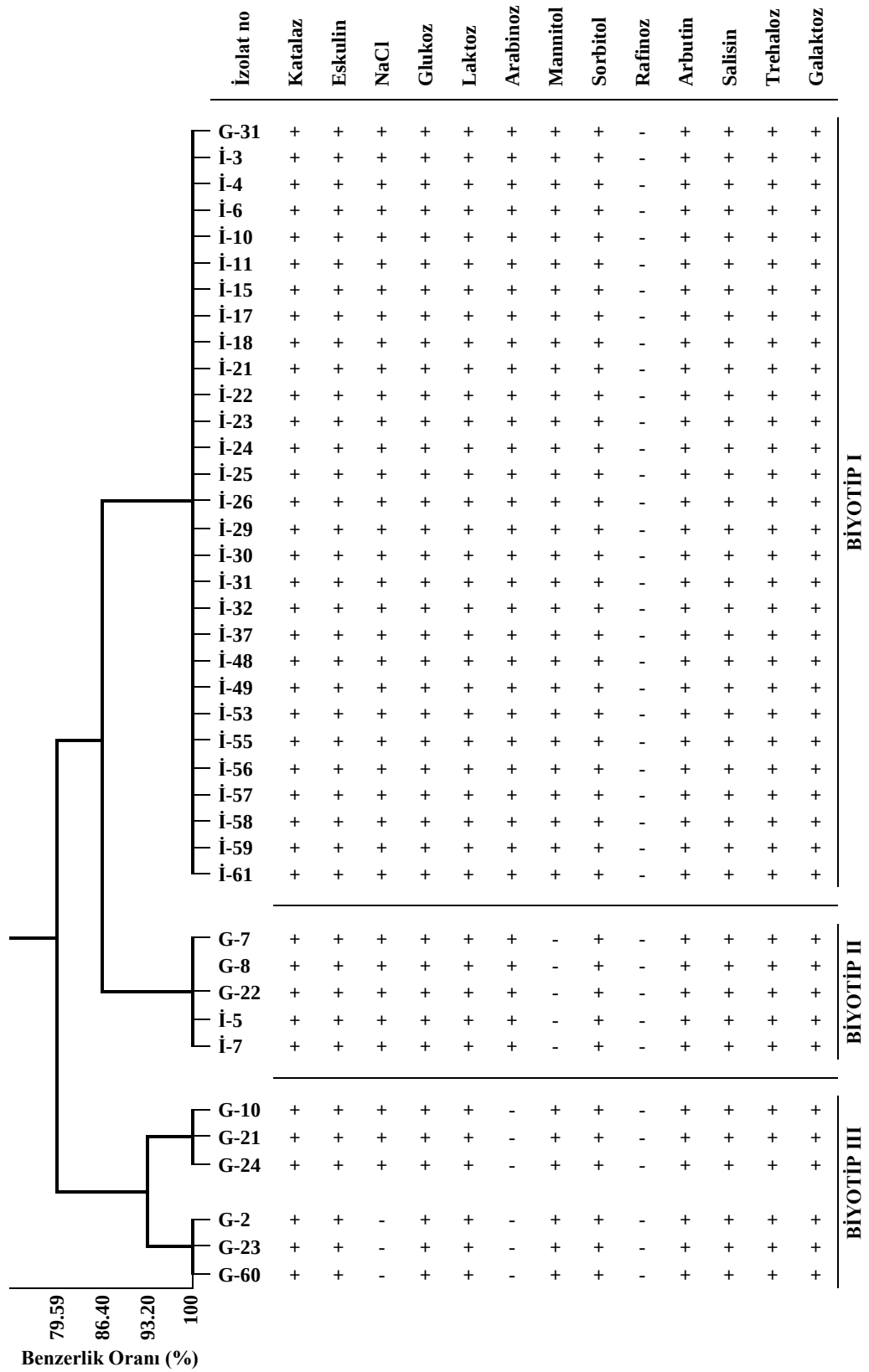
İncelenen kültürlerin %6.5 NaCl ortamında yapılan üreme testinde, *E. faecalis* olarak identifiye edilen 40 bakteri kültürünün 37 (%92.5)'si *E. faecium* olarak identifiye edilen 40 suşun ise 24 (%60)'ü pozitif bulundu. İncelenen enterokoklar eskülin ve arjinin hidrolizi yönünden değerlendirildiğinde *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının tamamı pozitif sonuç verdi. SIM besiyerinde yapılan H₂S oluşumu indol ve motilite testlerinde her iki türün tamamı söz konusu testler yönünden negatif bulundu.

Enterokok izolatlarının karbonhidrat fermentasyon özellikleri incelendiğinde *E. faecalis* suşlarının 34 (%85)'ü L-arabinoz ve 35 (%87.5)'i mannitol pozitif bulunurken tamamı rafinoz regatif bulundu. *E. faecium* suşlarının 9 (%22.5)'u rafinoz ve 36 (%90)'sı sorbitol pozitif bulundu. Diğer karbonhidratlardan glukoz, laktoz, sorbitol, arbutin, salisin, trehaloz ve galaktoz testlerinde *E. faecalis* suşlarının tamamı pozitif bulunurken; glukoz, laktoz, L-arabinoz, arbutin, salisin, trehaloz ve galaktoz yönünden *E. faecium* suşlarının tamamı pozitif bulundu.

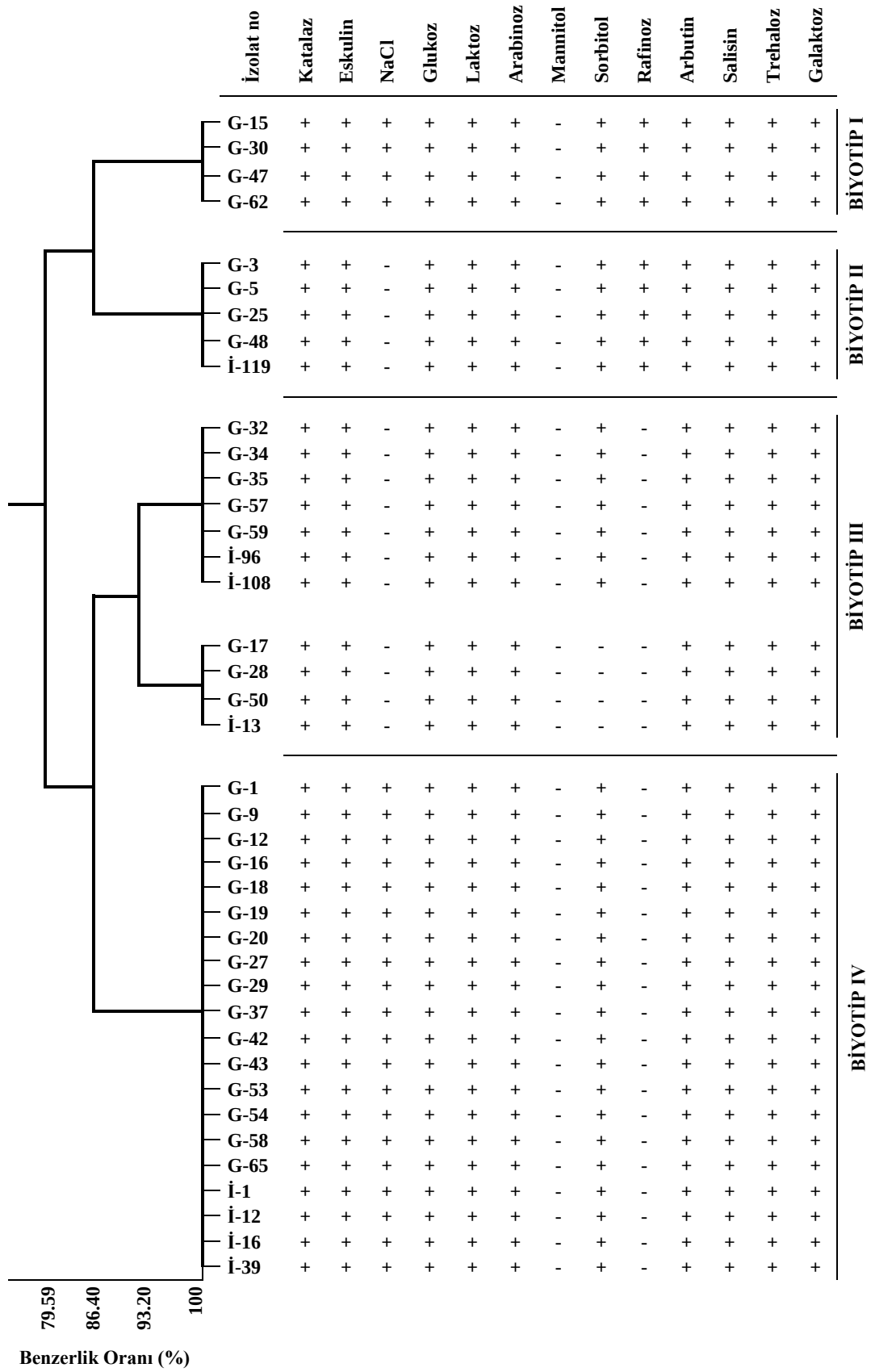
İzolatların biyokimyasal özellikleri küme değişken yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak incelendiğinde *E. faecalis* suşlarında 3, *E. faecium* suşlarında ise 4 biyotip profili tespit edildi (Tablo 4, Şekil 3 ve 4). *E. faecalis* suşlarında tespit edilen profillerden suşların 29 (%72.5)'u biyotip I, 5 (%12.5)'i biyotip II ve 6 (%15)'si da biyotip III olarak belirlenirken, *E. faecium* suşlarının 4 (%10)'ü biyotip I, 5 (%12.5)'i biyotip II, 11 (%27.5)'i biyotip III ve 20 (%50)'si ise biyotip IV olarak tespit edildi.

Tablo 3. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının biyokimyasal test sonuçları

Test adı	Pozitiflik oranları			
	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
	n	%	n	%
β- hemoliz	18	45	8	20
α- hemoliz	0	-	2	5
γ- hemoliz	22	55	30	75
Esculin hidrolizi	40	100	40	100
%6.5 NaCl'de üreme	37	92.5	24	60
Glukoz	40	100	40	100
Laktoz	40	100	40	100
L-Arabinoz	34	85	40	100
Mannitol	35	87.5	0	-
Sorbitol	40	100	36	90
Rafinoz	0	-	9	22.5
Arbutin	40	100	40	100
Salisin	40	100	40	100
Trehaloz	40	100	40	100
Galaktoz	40	100	40	100
Arjinin hidrolizi	40	100	40	100
H ₂ S testi	0	-	0	-
İndol testi	0	-	0	-
Hareket	0	-	0	-



Şekil 3. *Enterococcus faecalis* suşlarının biyotip dağılımı ve benzerlik oranları



Şekil 4. *Enterococcus faecium* suşlarının biyotip dağılımı ve benzerlik oranları

Tablo 4. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının biyotip profillerinin dağılımları

Biyotipler	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus faecium</i>	
	n	%	n	%
Biyotip I	29	72.5	4	10
Biyotip II	5	12.5	5	12.5
Biyotip III	6	15	11	27.5
Biyotip IV	-	-	20	50

4.3. Antimikrobiyel Duyarlılık Test Sonuçları

İncelenen enterokok kültürlerinin Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak Penisilin-G, Vankomisin, İmipenem, Siprofloksasin, Rifampisin, Gentamisin, Tetrasiklin, Eritromisin, Klindamisin, Trimethoprim / Sulfamethokzol ile yapılan antibiyogram test sonuçları, CLSI M02-A11 (2013) verilerine göre değerlendirildi (Tablo 4).

Tablo 5. Araştırmada kullanılan antimikrobiyel ajanların disk difüzyon yöntemine göre değerlendirme kriterleri ve zon çapları (mm) (CLSI M02-A11 2013)

Antimikrobiyel Madde	Dirençli	Orta Derece Etkili	Duyarlı
Penisilin-G (10 µg)	≤14	-	≥15
Eritromisin (15 µg)	≤13	14-22	≥23
Gentamisin (10 µg)	≤12	13-14	≥15
Tetrasiklin (30 µg)	≤14	15-18	≥19
Rifampisin (30 µg)	≤16	17-19	≥20
İmipenem (10 µg)	≤13	14-15	≥16
Vankomisin (30 µg)	≤14	15-16	≥17
Siprofloksasin (5 µg)	≤15	16-20	≥21
Klindamisin (2 µg)*	≤15	16-18	≥19
Trimethoprim/Sulfametoksazol (25 µg)	≤10	11-15	≥16

*: CLSI 2013'te değer bulunamadığından *Streptococcus* spp. kriter alınmıştır.

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının söz konusu antibiyotiklere karşı duyarlılık oranları Tablo 6 ve 7’de grafiksel dağılımları da Şekil 5 ve 6’da sunuldu.

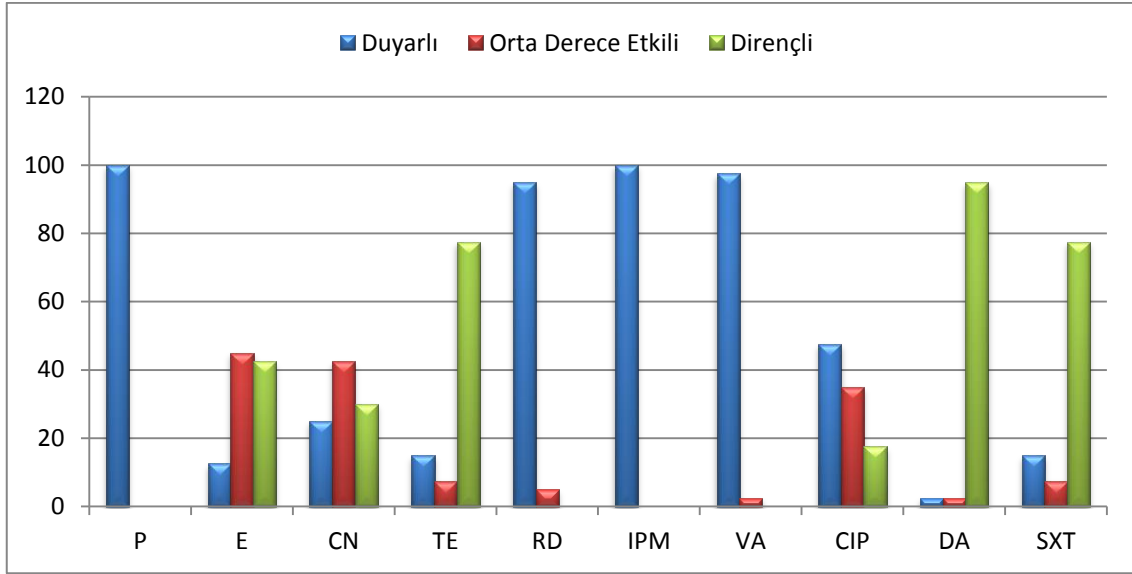
4.3.1. *Enterococcus faecalis* suşlarının antimikrobiyel duyarlılıkları

E. faecalis suşlarının incelenen antibiyotiklere karşı duyarlılık oranları Tablo 6’da grafiksel dağılımları da Şekil 5’te sunuldu.

Tablo 6. *E. faecalis* suşlarının disk diffüzyon yöntemi ile tespit edilen *in vitro* antimikrobiyel duyarlılık test sonuçları

Antimikrobiyel Madde	Duyarlı (%)	Orta Derece Etkili (%)	Dirençli (%)
Penisilin-G	40 (100)	0	0
Eritromisin	5 (12.5)	18 (45)	17 (42.5)
Gentamisin	10 (25)	17 (42.5)	12 (30)
Tetrasiklin	6 (15)	3 (7.5)	31 (77.5)
Rifampisin	38 (95)	2 (5)	0
İmipenem	40 (100)	0	0
Vankomisin	39 (97.5)	1 (2.5)	0
Siproflaksasin	19 (47.5)	14 (35)	7 (17.5)
Klindamisin	1 (2.5)	1 (2.5)	38 (95)
Trimethoprim/Sulfamethokzol	6 (15)	3 (7.5)	31 (77.5)

Disk diffüzyon yöntemi ile incelenen 40 adet *E. faecalis* suşunun tamamı penisilin G’ye, 5 (%12.5)’i eritromisine, 10 (%25)’u gentamisine, 6 (%15)’si tetrasiklin, 38 (%95)’i rifampisine, 40 (%100)’ı imipeneme, 39 (%97.5)’u vankomisine, 19 (%47.5)’u siprofloksasine, 1 (%2.5)’i klindamisine ve 6 (%15)’si trimethoprim/sulfamethakzole duyarlı bulundu. Suşların 17 (%42.5)’i eritromisine, 12 (%30)’si gentamisine, 31 (%77.5)’i tetrasikline, 7 (%17.5)’si siprofloksasine, 38 (%95)’i klindamisine ve 31 (%77.5)’i de trimethoprim/ sulfamethokzole dirençli olarak tespit edildi (Tablo 6, Şekil 5).



Şekil 5. *Enterococcus faecalis* suşlarının disk diffüzyon yöntemi ile tespit edilen *in vitro* antimikrobiyel duyarlılıklarının dağılımı

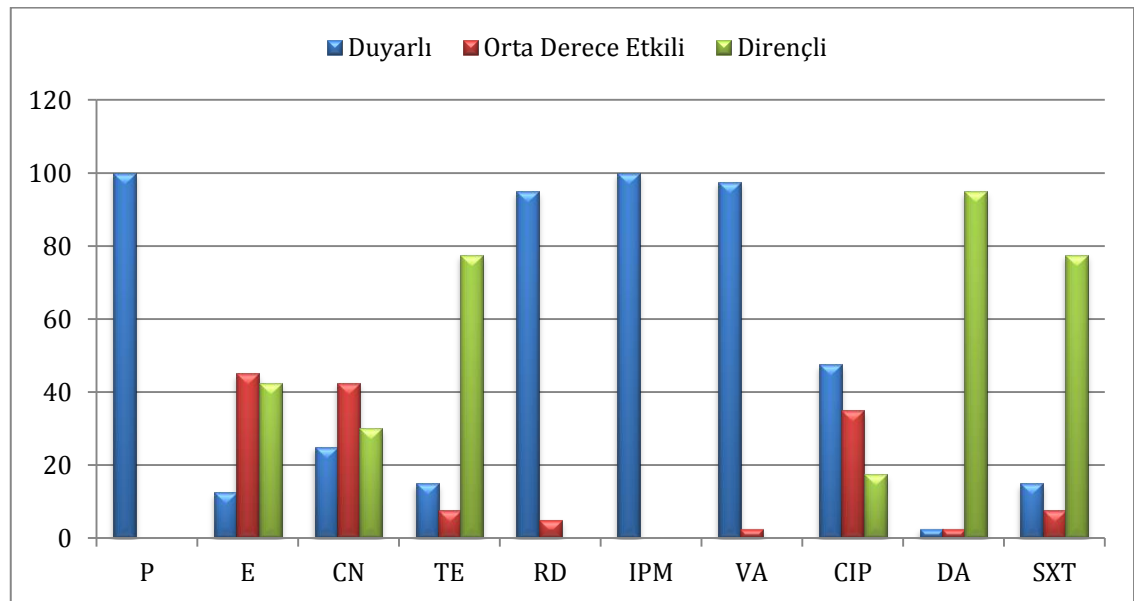
4.3.2. *Enterococcus faecium* suşlarının antimikrobiyel duyarlılıkları

E. faecium suşlarının incelenen antibiyotiklere karşı duyarlılık oranları Tablo 7’de grafiksel dağılımları da Şekil 6’da sunuldu.

Disk diffüzyon yöntemi ile incelenen 40 adet *E. faecium* suşunun 27 (%67.5)’si penisilin G’ye, 9 (%22.5)’u eritromisine, 34 (%85)’ü gentamisine, 31 (%77.5)’i tetrasiklin, 29 (%72.5)’u rifampisine, 28 (%70)’i imipeneme, 38 (%95)’i vankomisine, 18 (%45)’i siprofloksasine, 20 (%50)’si klindamisine ve 33 (%82.5)’ü trimethoprim/sulfamethakzole duyarlı bulundu. Suşların 13 (%32.5)’ü penisilin G’ye, 11 (%27.5)’i eritromisine, 6 (%15)’sı gentamisine, 7 (%17.5)’si tetrasikline, 3 (%7.5)’ü rifampisine, 11 (%27.5)’i imipeneme, 2 (%5)’si vankomisine, 8 (%20)’i siprofloksasine, 15 (%37.5)’i klindamisine ve 7 (%17.5)’si trimethoprim/sulfamethakzole dirençli olarak tespit edildi (Tablo 7, Şekil 6).

Tablo 7. *Enterococcus faecium* suşlarının disk diffüzyon yöntemi ile tespit edilen *in vitro* antimikrobiyel duyarlılık test sonuçları

Antimikrobiyel Madde	Duyarlı (%)	Orta Derece Etkili (%)	Dirençli (%)
Penisilin-G	27 (67.5)	0	13 (32.5)
Eritromisin	9 (22.5)	20 (50)	11 (27.5)
Gentamisin	34 (85)	0	6 (15)
Tetrasiklin	31 (77.5)	2 (5)	7 (17.5)
Rifampisin	29 (72.5)	8 (20)	3 (7.5)
İmipenem	28 (70)	1 (2.5)	11 (27.5)
Vancomisin	38 (95)	0	2 (5)
Siproflaksasin	18 (45)	14 (35)	8 (20)
Klindamisin	20 (50)	5 (12.5)	15 (37.5)
Trimethoprim/Sulfamethokzol	33 (82.5)	0	7 (17.5)



Şekil 6. *Enterococcus faecium* suşlarının disk diffüzyon yöntemi ile tespit edilen *in vitro* antimikrobiyel duyarlılıklarının dağılımı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enteroklar, insanlarda gastrointestinal kanalda yüksek düzeyde bulunmalarına karşın deri, oral kavite, alt solunum yolu ve ürogenital sistemlerde daha az sayıda normal flora etkeni konumundadırlar (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, konak organizması dışında 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 Facklam, 2003).

Özseven ve ark., (2011) idrar örneklerinden izole ettikleri 124 enterokok suşunun 60 (%48)'inin *E. faecalis* ve 61 (%49)'inin 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 tanımlanmış olduğunu; 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 tanımlanmış olduğunu; 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, incelenen 177 idrar örneğinden 119 (%67.2) adet, 90 gaita örneğinden de 68 (%75.5) adet olmak üzere toplam 187 *Enterococcus* spp. izole ve identifiye edildi. İzolatların multipleks PCR tekniği ile tür spesifik primerler kullanılarak yapılan identifikasyonlarında idrar orijinli enterokok suşlarının 30 (%25.2)'u ve gaita orijinli izolatların da 10 (%14.7)'u *E. faecalis* olarak identifiye edilirken; idrar orijinli enterokokların 8 (%6.7)'i ve gaita orijinli izolatların 32 (%47)'si de *E. faecium* olarak belirlendi.

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 olduğu gözlemlendi. İzolasyon oranlarında örnekler arasında veya yöresel bazda farklılıkların görülmesi ihtimal dahilindedir. Bu araştırmada idrar örneklerinde *E. faecium*'un (%6.7) ve gaita örneklerinde de *E. faecalis*'in (%14.7) izolasyon oranının oldukça düşük olduğu dikkati çekti.

Rutin laboratuvarlarda enterokokların identifikasyonu büyük oranda biyokimyasal yöntemlere göre yapılmaktadır. Yapılan birçok araştırmada (Facklam ve Collins, 1989; Monero ve Blanch, 1999; Garrote ve ark., 2000; Lang ve ark., 2001; Riboldi ve ark., 2008) enterokokların bilinen biyokimyasal profillerine rağmen saha suşlarının çoğunun yanlış identifiye edilebileceği ve bazı testler kullanılarak tespit edilen biyotip profillerini enterokok türlerinin identifikasyonunda bir kriter olarak kullanılabileceği vurgulanmaktadır.

Garrote ve ark., (2000) daha önce Facklam ve Sahm (1995) tarafından bildirilen standart identifikasyon şemaları ve API-20 kitleri ile identifiye edilen enterokok kültürlerinin VITEK 2 identifikasyon sistemi ile test edilmesi sonucu, suşların %87'sinin benzer şekilde identifiye edilebildiğini belirtmişlerdir.

Facklam ve Collins (1989), daha önce *Enterococcus* spp. olarak tanımlanmış 206 kültürün biyokimyasal özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, mannitol, sorbitol, sorboz ve arjinin reaksiyon sonuçlarına göre enterokoklarda 3 farklı biyotip tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

Monero ve Blanch (1999), referans enterokok kültürleri ve 82 saha orijinli izolatla enterokok yaptıkları biyokimyasal testlerde 94 farklı test uyguladıklarını, bu testlerin 76'sının enterokok türlerinin identifikasyonunda kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında biyokimyasal testlerin 12 tanesinin (L-arabinoz, riboz, sorboz, D-rafinoz, mannitol, methyl- α -D-glucopyranoside, sukroz, pyrrolidonyl aminopeptidase, arjinin, α -galaktoz, alkalın fosfat, ve sarı pigment üretimi) enterokok suşlarını tür bazında tanımlama aracı olarak güvenle kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Tespit ettikleri analiz tipleriyle yaptıkları identifikasyonlarda enterokok türlerinin identifikasyon oranının oldukça yüksek olduğunu gözlemlemiştir.

Lang ve ark., (2001), farklı tiplendirme tekniklerini kullanarak enterokok türlerini tiplendirmeye çalıştıkları araştırmalarında, 46 izolatın 23'ünde en yaygın biyotip profillerine rastladıklarını bildirmişlerdir. API-20 kitlerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında, suşların 9 farklı biyotip profilinde reaksiyon verdiğini tespit etmişlerdir.

Riboldi ve ark., (2008), inceledikleri 55 adet enterokok suşunun metabolik ve biyokimyasal özelliklerine göre yaptıkları analizlerde, 8 farklı biyotipi tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, izolatların biyokimyasal özellikleri değerlendirildiğinde *E. faecalis* suşlarında 3, *E. faecium* suşlarında ise 4 biyotip profili tespit edildi. *E. faecalis* suşlarında tespit edilen profillerden suşların %72.5'i biyotip I, %12.5'i biyotip II ve %15'i de biyotip III olarak belirlenirken, *E. faecium* suşlarının %10'u biyotip I, %12.5'i biyotip II, %27.5'i biyotip III ve %50'si ise biyotip IV olarak tespit edildi. Elde edilen bulguların, birbirleri ile örtüşmeyen diğer araştırmalardan farklı olduğu görülmektedir.

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 dikkat çekici bir şekilde yeni mekanizmalarla antibiyotik direnci oluşturduğu ve bu direnci plazmidler aracılığıyla aktarabildiği tespit edilmiştir (Moellering, 2000).

Son zamanlarda Gram pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde en çok kullanılan antimikrobiyel ajanlardan beta-laktamlar, aminoglikozidler, eritromisin, klindamisin ve trimethoprim/sulfamethoksol 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 trimethoprim/sulfamethoksol duyarlı görünseler de eksojen folat kaynaklarını kullanma yeteneğinde olduklarından bu ajana da dirençlidirler (Ulusoy, 1999; Güçkan ve ark., 2013).

Doğal direncin dışında diğer bir sorun da kazanılmış dirençtir. Enterokoklar; plazmid veya transpozonlar aracılığı ile birçok antibiyotiğe karşı çok kolay direnç geliştirebilme yeteneğine sahip olup bu yolla tetrasiklinler, makrolidler, linkozamidler ve kloramfenikole dirençli hale gelmişlerdir. Çok sayıdaki farklı aminoglikozid modifiye edici enzimleri ile yüksek düzey aminoglikozid direnci gösterirler. Bütün bunlara ilave olarak, ortaya çıkan plazmid kökenli beta-laktam direnci de başka bir sorundur. Çoğu enterokok beta-laktamazları yüksek düzey gentamisin direnç genini de taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmıştır (Ulusoy, 1999).

Penisilin direncinde rol oynayan asıl mekanizma, düşük afiniteli PBP'lerin üretimi ile ilişkilidir. Düşük afiniteli PBP'lerin (özellikle PBP 5) aşırı üretiminin penisilin direncine neden olduğu gösterilmiştir. Beta-laktamaz üretimi ise oldukça nadir görülen, edinsel ve inokuluma bağımlı bir dirençtir (Yıldırım, 2007).

Enterokokların beta-laktam grubu antibiyotiklere doğal dirençli oldukları bilinmektedir. Bu bakterilerde beta-laktamaz oluşturma özelliği transfer edilebilir bir plazmid tarafından kodlanmakta ve genellikle yüksek düzeyde gentamisin direnci de aynı plazmid tarafından sağlanmaktadır (Ulusoy, 1999; Yıldırım, 2007; Güçkan ve ark., 2013).

Ülkemizde enterokokların penisilin direncine yönelik yapılan bazı çalışmalarda Ruhi ve ark., (1997) %32, Ersoy ve ark., (2005) %40, Baykan (2001) %61, Özseven ve ark., (2011) %49, Kalaycı ve ark., (2011) %85 oranında penisilin direnci tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Berzeg (2005); çeşitli klinik materyallerden izole edilen *E. faecalis* suşlarında %4, *E. faecium* suşlarında ise %68 oranında direnç saptarken; Altun ve ark., (2013), klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* suşlarında %16, *E. faecium* suşlarında ise %83 oranında direnç tespit ettiklerini bildirmektedirler.

Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının tamamı penisillin G'ye duyarlı bulunurken, *E. faecium* suşlarının ise %67.5'i dirençli bulundu. Bu durum, çalışmalarda görüldüğü üzere enterokoklar beta-laktam antibiyotiklere karşı zaman içinde bilinçsizce çok sık ve uzun süre düzensiz kullanım sonucu giderek artan bir direnç geliştiği şekilde yorumlanabilir.

Enteroklarda makrolid antibiyotiklere karşı direnç oranları oldukça yüksek düzeylerde (%40-100) bildirilmektedir (Ulusoy ve ark., 1995; Aktepe ve ark., (2011). Aral ve ark., (2011), klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının eritromisin direncinin %55.6 olduğunu, daha önce yaptıkları başka bir çalışmada ise bu direncin %51.3 olarak saptandığı bildirmişlerdir. Moaddab ve Töreci (1999) inceledikleri enterokok suşlarında %89; Baykan, (2001) %55; Özseven ve ark., (2011) %82; Kalaycı ve ark., (2011) ise enterokoklarda %69.6 oranında eritromisin direnci tespit etmişlerdir. Aral ve ark., (2011) çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının eritromisin direncini sırasıyla %56 ve %100 olarak belirlediklerini bildirmektedirler. Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının %42.5'i, ve *E. faecium* suşlarının ise %27.5'i eritromisin'e dirençli bulundu.

Enterokoklarda bir veya daha fazla aminoglikozide yüksek düzeyli direnç, artan sıklıkta bildirilmektedir (Gordon ve ark., 1992, Strausbaugh ve Gilmore, 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'ının; 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* suşlarının %30'u ve *E. faecium* suşlarının ise %15'i gentamisin dirençli bulundu. Elde edilen bulguların, diğer çalışmalarda tespit edilen sonuçlardan daha düşük olduğu dikkati çekti. Enteroklardaki gentamisin yüksek düzey direncinin sıklıkla fluorokinolon direnci ile kombine olduğu ifade edilmiştir (Leclercq, 1997).

Tetrasiklinler (doksisisiklin, minoksiklin ve tetrasiklin), protein sentezinin inhibisyonunu sağlayarak genellikle bakteriyostatik etki gösterirler. Geniş spektrumlu olmalarından dolayı diğer antimikrobiyel maddelere direnç gösteren Gram pozitif ve Gram negatif birçok bakteriye karşı inhibitör etkiye sahiptirler. Selektif etkileri çoğunlukla ribozomal düzeyde olmayıp, duyarlı bakteri hücrelerine konakçı hücresinden daha fazla girmelerine bağlıdır. Yaygın kullanımları sonucu birçok bakteri türünde direnç gelişimi gün geçtikçe artmaktadır (Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013). Yapılan araştırmalarda Baykan (2001) idrar örneklerinden izole edilen enterokokların %52'sinin; Mete ve Kaleli (2006) sığır besicilerinden izole ettikleri enterokokların %29'unun; Özseven ve ark., (2011) çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının %57'sinin; Kalaycı ve ark., (2011) idrar örneklerinden izole edilen enterokokların %28'inin dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Güçkan ve ark., (2013) ise çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının %68'inin ve *E. faecium* suşlarının da %60'ının tetrasikline dirençli olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının %77.5'i ve *E. faecium* suşlarının ise %17.5'i tetrasikline dirençli bulundu. *E. faecium* suşlarında düşük oranda direnç saptanırken, *E. faecalis* suşlarındaki direnç yüksekliğinin dikkat çekici düzeyde olduğu gözlemlendi.

Rifampisin ve tetrasikline, günümüze dek enterokok infeksiyonlarının sağaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların terapötik etkinliklerini saptamak güçtür. Bunun nedeni ise, bu iki ajan genellikle başka antibiyotiklerle birlikte kullanılmaktadır. Enterokoklarda rifampisin ve tetrasiklin karşı direnç gelişimi değişik oranlarda tespit edilmektedir. Ulusoy ve ark., (1995) yaptıkları bir çalışmada rifampisin ve tetrasilin dirençlerini sırasıyla %93 ve %58 olarak tespit etmişlerdir. Ertek ve ark., (2003)'nın yaptığı çalışmada VRE suşlarının rifampisine %85 oranında dirençli olduğunu; Özseven ve ark., (2011) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri enterokok suşlarının %94'ünün; Berzeg (2005) çeşitli klinik materyallerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %40'ının ve *E. faecium* suşlarının da %68'inin rifampisine dirençli olduklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının tamamı rifampisine duyarlı bulunurken, *E. faecium* suşlarının ise %7.5'i rifampisine dirençli bulundu. Yörede rifampisin kullanımı halen devam etmektedir.

Karbapenemler güçlü indükleyiciler olup enzim hidrolizine de dayanıklıdır ve hem indüklenebilir hem de stabil dereprese organizmalara karşı etkilidirler (Akata, 1997). Doripenem, *E. faecalis* suşlarına ve *E. faecium* dışı enterokok suşlarına karşı meropenem ve ertapenemden iki kat daha etkin, imipenemden ise iki kat daha az etkindir. Öte yandan vankomisine dirençli *E. faecium* suşlarının tümü doripeneme dirençlidir (Keam, 2008; Bazan ve ark., 2009; Sahm, 2009). Karbapenemlerden imipenemin enteroklarda kullanımı için EUCAST tarafından kabul edilen MIC eşik değeri kullanılmaktadır.

Ersoy ve ark., (2005), klinik örneklerden izole ettikleri enterokok suşlarında imipenem direncini %19 oranında belirlerken Kart ve ark., (2010), çocuk kliniği ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen enterokoklarda imipenem direncini %74 oranında tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada Aktepe ve ark., (2011) klinik örneklerden izole ettikleri enterokoklarda imipenem direncinin %51.9 olarak tespit edildiğini ancak direnç oranının *E. faecium* da %70'lere ulaştığını belirtmektedirler. Berzeg (2005), çeşitli klinik materyallerden izole ettiği *E. faecalis* suşlarının tamamının ve *E. faecium* suşlarının da %87.5'inin imipeneme duyarlı olduğunu; Aral ve ark., (2011), çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının tamamının imipeneme duyarlı ve *E. faecium* suşlarının da %94'ünün

imipeneme dirençli bulunduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının tamamı imipeneme duyarlı bulunurken, *E. faecium* suşlarının ise %27.5'i dirençli bulundu. Direnç oranının diğer yörelerdeki izolatlarla göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Vankomisin'in, halen enterokoklara karşı en etkili antibiyotik olduğunu bildiren çok sayıda çalışma bulunmasına karşılık, vankomisin dirençli suşların sayısında önemli oranlarda artış olduğu da bildirilmektedir. Günümüzde birçok ülkede kolonizasyon ve enfeksiyon etkeni olarak vancomycine dirençli enterokoklar (VRE) karşımıza çıkmaktadır (Güçkan ve ark., 2013).

Enterokok türlerinden *E. faecalis* enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen türdür. *E. faecium* ise en yüksek oranda vankomisin direncine sahiptir. Vankomisin 30 yıldan daha uzun bir süre direnç sorunu olmadan klinikte kullanılmış bir antibiyotiktir. Son zamanlarda özellikle kan kültürü orijinli, *E. faecalis*'in *E. faecium*'a oranı 3.7/1 den 1.9/1'e düşmüştür. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da birçok merkezde nozokomiyal *E. faecium* izolatlarının %50'si vankomisin dirençli bulunmuştur (Sümerkan, 2001). İlk VRE 1988 yılında Uttley ve ark., (1988) tarafından İngiltere'de bildirilmiştir.

Ülkemizde ilk defa Vural ve ark., (1999) tarafından Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde glikopeptid grubu antibiyotiklere dirençli bir *E. faecium* suşu bildirilmiştir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokokların vankomisin direncine yönelik yapılan çalışmalarda suşların tamamının vankomisin duyarlı bulunduğu tespit edilmiştir (Baykan, 2001; Mete ve Kaleli, 2006; Kalaycı ve ark., 2011; Güçkan ve ark., 2013)

Çek Cumhuriyeti'nde yapılan bir çalışmada Kolar ve ark., (2001) hematoloji ve onkoloji servisinde yatan hastalarda 1998 yılında VRE oranı %15.1 iken glikopeptid ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanımının kısıtlanması ile bu oranın 2000 yılında %6.1'e düştüğünü ifade etmişlerdir. Ertek ve ark., (2003), çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının %10.3'ünün ve *E. faecium* suşlarının da %27'sinin; Iraz ve ark., (2012) *E. faecalis* suşlarının %4'ünün ve *E. faecium* suşlarının da %23'ünün vankomisin dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Altun ve ark., (2013) ise çeşitli

klirik örneklerden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının tamamını duyarlı bulduklarını, *E. faecium* suşlarının da %16.1'nin vankomisin dirençli olduğunu belirtmektedirler.

Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının tamamı vankomisin duyarlı bulunurken, *E. faecium* suşlarının ise %5'i vankomisin dirençli bulundu.

Kinolonlar DNA giraz enzimini inhibe ederek aktivite gösteren antimikrobik ajanlardır. Gram negatif basillere, *S. aureus* ve koagulaz negatif stafilokoklara karşı etkilidirler ancak streptokok ve enterokoklara karşı etkileri azdır (Kaya, 1997; Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013).

Kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasinle yapılan çalışmalarda Baykan (2001), idrar örneklerinden izole ettiği enterokok suşlarında siprofloksasin direncini %22 oranında saptarken; Kart ve ark., (2010), ocuk kliniği ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole ettikleri enterokok suşlarında %68; Kalaycı ve ark., (2011), idrar örneklerinden izole edilen enterokok suşlarında %53;  zseven ve ark., (2011) ise çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri enterokok suşlarında %90 oranında direnç tespit etmişlerdir.

Berzeg (2005) eşitli klinik materyallerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %8'inin ve *E. faecium* suşlarının da %68'inin; Aral ve ark., (2011) eşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının %27'sinin ve *E. faecium* suşlarının da %69'unun; Iraz ve ark., (2012) *E. faecalis* suşlarının %47'sinin ve *E. faecium* suşlarının da %84'ünün; Güçkan ve ark., (2013), çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının %50'sinin ve *E. faecium* suşlarının da %44'ünün siprofloksasine dirençli olduğunu bildirmektedirler. Avrupa'da yapılan çok merkezli bir çalışmada, siprofloksasine direnç oranı *E. faecalis* suşlarında %6 ve *E. faecium* suşlarında ise %33 olarak bulunmuştur (Schouten ve ark., 1999). Amerika'da yapılan çok merkezli diğer bir çalışmada ise izole edilen enterokok türlerinde siprofloksasin direnci %65 olarak bildirilmiştir (Doern ve ark., 1999). Bu çalışmada, incelenen *E. faecalis* suşlarının %17.5'i, ve *E. faecium* suşlarının ise %20'si siprofloksasine dirençli bulundu. Çalışmada her iki enterokok türünde de direnç oranının diğer çalışmalara göre daha düşük olduğu gözlendi.

Makrolidler, bakteriyel RNA'ya bağımlı protein sentezini 50S ribozomal alt ünite düzeyinde inhibe ederek genellikle bakteriostatik etki gösteren antimikrobiyel maddelerdir (Ustaçelebi ve ark., 1999; Beers ve Berkow, 2002; Arda, 2006; CLSI, 2013).

E. faecalis gerekse *E. faecium* şuşları, makrolid grubu antibiyotikler ve klindamisin karşı genellikle yüksek oranlarda direnç göstermektedirler. Aral ve ark., (2011), çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* şuşlarının tamamının ve *E. faecium* şuşlarının da %99'unun; Güçkan ve ark., (2013) ise çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* şuşlarının %95'inin ve *E. faecium* şuşlarının da %89'unun klindamisin dirençli olduğunu bildirmektedirler. Bu çalışmada incelenen *E. faecalis* şuşlarının %95'i ve *E. faecium* şuşlarının ise %37.5'i klindamisin dirençli bulundu. Özellikle birçok antibiyotiğe direnç oranı yüksek olan *E. faecium* şuşlarında klindamisine direnç oranının düşüklüğü dikkati çekmiştir.

Bakterilerde prekürsör sentezinin inhibisyonu sonucu nükleik asit sentezi inhibe ederek aktivite gösteren sulfanomidler ve trimethoprim, DNA replikasyonunda görev alan DNA polimeraz ve transkripsiyonda rol alan RNA polimeraz enzimlerinin görevlerinde bozukluklar oluşturarak etkilerini göstermektedirler (Kaya, 1997; Arda, 2006).

Baykan (2001), idrar örneklerinden izole ettiği enterokok şuşlarında TRM/SXT direncini %69 oranında saptarken; Aral ve ark., (2011) çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* şuşlarının tamamının; Güçkan ve ark., (2013) ise çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* şuşlarının tamamının ve *E. faecium* şuşlarının da %98'inin trimethoprim/sulfamethaxazole dirençli olduğunu bildirmektedirler.

Bu çalışmada incelenen *E. faecalis* şuşlarının %77.5'i, ve *E. faecium* şuşlarının ise %17.5'i TRM/SXT dirençli bulundu. Çalışmada tespit edilen direnç oranlarının diğer çalışmalara göre düşüklüğü yörede bu tür antibiyotiklerin etkinliğinin hala devam ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada;

- Van ve yöresinde *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının izolasyon oranının diğer yörelere göre daha düşük olduğu tespit edildi.
- Enterokok türlerindeki fenotipik değişikliklerden dolayı PCR bazlı tekniklerle yapılacak epidemiyolojik çalışmaların identifikasyon güvenilirliklerinin oldukça yüksek olduğu;
- Enterokok türlerinin biyokimyasal yöntemlerle identifikasyonunun güvenilir sonuçlar vermediği ve yanlış negatiflik oranının önemli düzeyde olduğu; saha suşlarındaki çeşitlilikten dolayı biyotip profillerinin bilinmesinin yanlış identifikasyon oranının düşürülmesine önemli katkı sağlayabileceği;
- Van ve yöresinde *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antimikrobiyel ajanlara karşı direnç oranlarının yeniden güncellenme fırsatının bulunduğu ve mevcut direnç durumu hakkında bir fikir sahibi olunmasına katkı sağlayacağı kanaatine varıldı.

ÖZET

Tollu G., İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının biyotiplendirilmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Veteriner Programı), Yüksek Lisans Tezi, Van, Türkiye, 2014. Bu çalışmada, Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesinin mikrobiyoloji laboratuvarına analiz için getirilen idrar ve gaita örneklerinde *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının varlığı, yaygınlığı, biyotiplendirilmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması amaçlandı. Çalışmada, hastaların izni ve onayı ile alınan rutin 177 idrar örneğinden 119 (%67.2) adet, 90 gaita örneğinden de 68 (%75.5) adet olmak üzere toplam 187 adet *Enterococcus* spp. izole edildi. İzolatların multipleks PCR tekniği ile tür spesifik primerler kullanılarak yapılan identifikasyonlarında idrar orijinli enterokok suşlarının 30 (%25.2)'u ve gaita orijinli izolatların da 10 (%14.7)'u *E. faecalis* olarak tanımlanırken; idrar orijinli enterokokların 8 (%6.7)'i ve gaita orijinli izolatların 32 (%47)'si de *E. faecium* olarak belirlendi. Araştırmada, 13 biyokimyasal test baz alınarak yapılan biyotiplendirmede *E. faecalis* suşlarında tespit edilen profillerden suşların %72.5'i biyotip I, %12.5'i biyotip II ve %15'i de biyotip III olarak belirlenirken, *E. faecium* suşlarının %10'u biyotip I, %12.5'i biyotip II, %27.5'i biyotip III ve %50'si ise biyotip IV olarak tespit edildi. Yapılan antibiyogram testinde, incelenen *E. faecalis* suşlarının tamamı penisillin G ve imipeneme duyarlı bulunurken, suşların %95'i klindamisine, %77.5'i tetrasiklin ve trimetoprim / sulfametoksazole, %42.5'i eritromisine, %30'u gentamisine ve %17.5'i de siprofloksasine dirençli bulundu. İncelenen *E. faecium* suşlarının %37.5'i klindamisine, %32.5'i penisilin G'ye, %27.5'i eritromisin ve imipeneme, %20'si siprofloksasine, %17.5'i tetrasiklin ve trimetoprim / sulfametoksazole, %15'i gentamisine ve %5'i de vankomisine dirençli bulundu. Araştırmada PCR tekniği ile tanımlanan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında yapılan biyotiplendirme sonucuna göre enterokok türlerinin biyokimyasal testler ile identifikasyonlarında olası farklı biyotiplerin dikkate alınması gerektiği, antibiyotik duyarlılık test sonuçlarının ise epidemiyolojik ve klinik yaklaşımlara önemli katkılar sağlayacağı kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Enterokok, Biyotiplendirme, Antibiyotik duyarlılık

SUMMARY

Tollu G., Biotyping and antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from urine and stool samples, Yüzüncü Yıl University, Health Sciences Institute, Department of Veterinary Microbiology (Veterinary Programme), Master Thesis, Van, Turkey, 2014. The aim of this study was to determine the prevalence, biotyping and in vitro antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from a total of 267 routine urine and stool samples which were brought to the microbiology laboratory of Regional Training and Research Hospital of Van, with permission of the patients. In presented study, 119 (67.2%) *Enterococcus* spp. were isolated from 177 urine and 68 (75.5%) from 90 stool samples. The isolates were identified by multiplex PCR by using species-specific primers for *E. faecalis* and *E. faecium*. Out of 187 isolates, 30 (25.2%) and 10 (14.7%) were identified to be *E. faecalis* from urine and stool respectively, whereas 8 (6.7%) of stool and 32 (47%) of urine isolates were identified as *E. faecium*. Biotyping based on 13 biochemical tests showed that 72.5%, 12.5% and 15% of *E. faecalis* strains included biotype I, II and III respectively, whereas *E. faecium* strains could be divided as biotype I (10%), biotype II (12.5%), biotype III (27.5%) and biotype IV (50%). Additionally, all *E. faecalis* strains were found to be susceptible to penicillin G and imipenem. On the other hand, 95% of *E. faecalis* strains were found to be resistant to clindamycin, 77.5% to tetracycline and trimethoprim / sulfamethoxazole, 42.5% to erythromycin, 30% to gentamicin and 17.5% to ciprofloxacin. Out of *E. faecium* strains, 37.5% were found to be resistant to clindamycin, 32.5% to penicillin G, 27.5% to erythromycin and imipenem, 20% to ciprofloxacin, 17.5% to tetracycline and trimethoprim / sulfamethoxazole, 15% to gentamicin and 5% to vancomycin. In conclusion, identification of *E. faecalis* and *E. faecium* strains by PCR is reliable and faster than those of biochemical tests. It should also be taken in account that the possible different biotypes can be found within *Enterococcus* spp. by biochemical tests, which may be important for the epidemiological investigations. Additionally, the results of antimicrobial susceptibility test may provide important contributions to clinical approach.

Keywords: Enterococcus, Biotyping, Antimicrobial susceptibility

KAYNAKLAR

- Aguş N, Sarıca A, Özkalay N, Cengiz A (2006). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnci, *ANKEM Derg*, 20, 3, 145-147.
- Akata F (1997). Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz tipleri ve antibiyogramdan betalaktamaz tipini tahmin etmede kullanılabilecek yöntemler. *İnfeksiyon Derg*, 11, 303-309.
- Aktepe OC, Aşık G, Çiftçi İH, Çetinkaya Z (2011). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 41, 2, 86-90.
- Albay A (1998). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ders Notları, 71-86, GATA Basımevi, Ankara.
- Altun D, Erdem G, Çöplü N, Çağatay M (2013). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının çeşitli yöntemlerle araştırılması. *ANKEM Derg*, 27, 3, 130-134.
- Andrews F, Horder TA (1906). Study of streptococci pathogenic for man. *Lancet*, 2, 708-713.
- Anonim 1. <http://www.antimicrobe.org/new/b03.asp>
- Anonim 2. <https://www.sheffield.ac.uk/mbb/staff/smesnage>
- Aral M, Paköz NİE, Aral İ, Doğan S (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci, *Türk Hij Der Biyol Derg*, 68, 2, 85-92.
- Arda M (2006). Temel Mikrobiyoloji, 3. Baskı, 80-102, Medisan Yayınları, Ankara.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N ve Akay Ö (1997). Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar Ders Kitabı. Medisan yayınları No:26. Ankara.
- Barisic Z, Punda-Polic V (2000). Antibiotic resistance among enterococcal strains isolated from clinical specimens, *Int J Antimicrob Agents*, 16, 1, 65-68.
- Baron EJ, Finegold SM (1990). Streptococci and related genera, "Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology", 8th Ed, The C.V. Mosby Company. St. Luis, USA. Pp. 25, 336-352
- Barrie PS, Christou NV, Patchen DE (1990). Patogenicity of the enterococcus in surgical infections. *Annals of Surgery*, 212, 155-159.
- Başustaoğlu A, Aydoğan H (2002). Enterokoklar, *İnf Hast Serisi*; 5, 2, 45-60.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45(4), 493-496.
- Baykan M (2001). İdrar örneklerinden izole edilen enterokokların *in vitro* antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Genel Tıp Derg*, 11, 3, 119-121.

- Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Çitil BE, Turan D, Öngen B, Özyurt M, Açikel CH, Haznedaroğlu T (2011). Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virulens faktörleri arasındaki ilişki. *Mikrobiyol Bul*, 45, 3, 430-445.
- Bazan JA, Martin SI, Kaye KM (2009). Newer beta-lactam antibiotics: doripenem, ceftobiprole, ceftaroline and cefepime. *Infect Dis Clin North America*, 23, 4, 983-996.
- Beers MH, Berkow R (2002). İnfeksiyon hastalıkları, in 'The Merck Manual of Diagnosis and Therapy', Bölüm 13, çeviri editörü, A Çağatay, çeviri, Ş Artan, 1.Baskı, 1085-1127, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Berzeg D (2005). Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci ve E test ile vankomisin MİK değerlerinin değerlendirilmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Berzeg D, Kart Yaşar K, Şengöz G, Batı Kutlu S, Nazlıcan Ö (2005). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 35, 279-283.
- Bağırkan Ş (1993). İstatistiksel Analiz, Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul.
- Bilgehan H (1995). "Streptokoklar" Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakterioloji ve Bakteri İnfeksiyonları. 9.Basım. İzmir: Şafak Matbaacılık, 248-286.
- Billström H (2008). Molecular epidemiology of clinical *E. faecium*. Thesis From the Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
- Butler KM (2006). Enterococcal infection in children. *Seminars in Pediat Infect Dis*, 128-139.
- Carter GR (1984). Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. Fourth edition. Springfield, Illinois, USA.
- Chenoweth C, Schaberg D (1990). The epidemiology of enterococcus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9, 80-89
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility 23th informational supplement. CLSI Document M100-S23, (ISBN1-56238-865-7-Print:1-56238-866-5-Electronic) Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania, 19087 USA.
- Çetinkaya Y (2000). Vankomisin dirençli enterokoklar: epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, 5, 24-33.
- Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev*, 13, 686-707.
- Danielle MZ, Garrison MM, Allpress AL, Heath J, Christakis DA (2005). Infection control policies and hospital-associated infections among surgical patients: variability and associations in a multicenter pediatric setting. *Pediatrics*, 115, 387-397.

- Dargere S, Vergnaud M, Verdon R, Saloux E, Page OL, Leclercq R, Bazin C (2002). *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J Clin Microbiol*, 40, 6, 2308-2310.
- Devriese L, Baele M, Butaye P (2006). The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*. 4, 163-174.
- Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, Kugler K, Beach ML (1999). Bacterial pathogens isolated from patients with skin and soft tissue infections: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada 1997), *Diagn Microbiol Infect Dis*, 34, 1, 65-72.
- Domig JK, Mayer HK, Kneifel W (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno- and genotypic criteria, *Int J Food Microbiol*, 88, 2-3, 165-188.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 24-27.
- Eliopoulos GM, Eliopoulos CT (1990). Therapy of Enterococcal Infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9, 118-126.
- Ergin ÖY, Bayram ED, Uzun B, Güngör S, Demirdal T (2013). İdrar kültürlerinden izole edilen *Enterococcus* türleri ve antibiyotik dirençleri. *ANKEM Derg*, 27, 4, 173-178.
- Ersoy Y, Bayraktar M, Fırat M, Yağmur M, Durmaz R (2005). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Derg*, 19, 2, 92-96.
- Ertek M, Yazgı H, Aktaş AE, Erol S (2003). Vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunun araştırılması ve diğer antimikrobiyellere duyarlılıkları. *İnfek Derg (Turk J Infect)*, 17, 4, 447-451.
- Facklam RR, Collins MD (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol*, 27, 4, 731-734.
- Facklam RR, Sahm DF (1995). *Enterococcus*. In: Murray, PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington: ASM Press, pp: 308-314.
- Facklam RR, Tenover FC (1998). *Enterococcus*. In: Collier L, Tenover FC, Murray PR, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington: ASM Press, pp: 669-682.
- Facklam RR, Tenover FC (1991). *Streptococcus* and related catalase negative Gram positive cocci. In: Ballows A, Hausler WJ. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed., Washington DC: American Society for Microbiology Published; pp: 238-257.
- Fisher K, Phillips C (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol*, 155, 1749-1757.
- Garrote GI, Abraham AG, De Antoni GL (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J Food Prot*, 63, 364-369.

- Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Ecemiş T, Özbakkaloğlu B (2004). Hastane kökenli *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında antimikrobiyel direnç. *Ankem Derg*, 18, 1, 49-52.
- Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, Thornsberg C, Jarvis WR, Tenover FC (1992). Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J Clin Microbiol*, 30, 9, 2373-2378.
- Graham NC, Bartley EO (1939). Some observations on the classification of Enterococci. *J Hygiene*, 39, 538-552.
- Güçkan R, Elmas A, Tilgel S, Yüksel G (2013). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Int J Basic Clin Med*, 1, 2, 74-77.
- Gülay Z (2008). Gram pozitif bakteri infeksiyonları: direnç ve epidemiyoloji. *ANKEM Derg*, 22, Ek 2, 276-286.
- Harrigan WF, McCance MM (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc., London.
- Herwaldt LA, Wenzel RP (1995). Dynamics of hospital-acquired infection. Manual of Clinical Microbiology. 6th edition, Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp: 169-181.
- Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A (2009). Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. *J Public Health*, 17, 243-249.
- Hoşgör M, Çavuşlu C, Tünger A, Özinel MA (1997). Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci. *İnfeksiyon Derg*, 11, 1, 7-9.
- Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*, 4, 2, 239-249.
- Iraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y (2012). Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 26, 4, 176-180.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *J Clin Microbiol*, 42, 8, 3558-3565.
- Kaçmaz B, Akça G, Çağlar K, Sultan N (2003). Enterokoklarda antimikrobiyel duyarlılık. *ANKEM Derg*, 17, 28-32.
- Kalaycı Ö, Yurtsever S, Güngör S, Uzun B, Kurultay N (2011). İdrar örneklerinden izole edilen Enterokokların *In vitro* antibiyotiklere direnç oranlarının değerlendirilmesi. *Klimik Derg*, 24, 2, 105-107.
- Kalina AP (1970). The taxonomy and nomenclature of enterococci. *IJSEM*, 20, 2, 185-189.
- Kandler O, Schleifer KH, Dandl R (1968). Differentiation of *Streptococcus faecalis* andrewes and horder and *Streptococcus faecium* orla-jensen based on the amino acid composition of their murein. *J Bacteriol*, 96, 1935-1939.
- Kapoor L, Randhawa VS, Deb M (2005). Antimicrobial resistance of enterococcal blood isolates at a pediatric care hospital in India. *Jpn J Infect Dis*, 58, 2, 101-103.

- Karadenizli A, Kolaylı F (2002). Kocaeli Üniversitesi tıp fakültesi hastanesinde izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 32, 3-4, 212-215.
- Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 38, 3092-3095.
- Kart KY, Pehlivanoglu F, Şimşek M, Şengöz G (2010). Çocuk kliniği ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci. *Zeynep Kamil Tıp Bül*, 41, 3, 143-147.
- Kayaoglu G, Orstavik D (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 308-320.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard CH, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1999). Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol*, 37, 3497-3503.
- Keam SJ (2008). Doripenem. A review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs*, 68, 14, 2021-2057.
- Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W (1995). VanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett*, 125, 165-171.
- Kolar M, Vagnerova I, Pantucek R, Cermak P (2001). Impact of rational antibiotic usage on occurrence of vancomycin-resistant enterococci in hematological patients. *Clin Microbiol Infect*, 7, Suppl 1, 91.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM (1997). The Gram Positive Cocci Part II Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Philadelphia: Lippincott, pp: 577-629.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1992). *Enterococcus* species. In: Koneman EW (ed.) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fourth edition, Philadelphia: Lippincott Company, pp: 440-446.
- Koneman, EW, Allen, SD, Dowell, VR, Janda, WM Sommers, HM, Winn, WC (1988). Color atlas and text book of diagnostic microbiology third edition. Lippincott comp. Philadelphia, USA.
- Lang MM, Ingham SC, Ingham BH (2001). Differentiation of *Enterococcus* spp. by cell membrane fatty acid methyl ester profiling, biotyping and ribotyping, *Lett Appl Microbiol*, 33, 65-70.
- Lautenbach E, Bilker W, Brennan P (1999). Enterococcal bacteremia: risk factor for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 20, 5, 318-323.
- Leclercq R (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*, 24, Suppl. 1, 80-84.
- Lenette EH, Balows A, Hausler JWJ, Shadomy JH (1985). Manual of Clinical Microbiology. USA. 4, 1149.

- Loza E, Martinez B, J Baquero LA, Canton R, Garijo B (1992). Comparative *in vitro* activity of clarithromycin. Spanish Collaborative Group, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11, 9, 856-866.
- Manero A, Blanch AR (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical Key, *Appl Environ Microbiol*, 65, 10, 4425-4430.
- Mascini EM, Troelstra A, Beitsma M (2006). Genotyping and preemptive isolation to control an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis*, 42, 739-746.
- Meriç M, Rüzgar M, Gündeş S, Willke A (2004). Hastanede yatan hastalardan izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere direnç durumu. *ANKEM Derg*, 18, 141-144.
- Mert-Dinç B, Aykut-Arca E, Yağcı S, Karabiber N (2009). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında *in vitro* antibiyotik duyarlılığı, *Türk Hij Den Biyol Derg*, 66, 3, 117-121.
- Mete E, Kaleli İ (2006). Besici ve sığırlardan izole edilen enterokok türlerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bült*, 40, 75-80.
- Moaddab SR, Töreci K (1999). Enterokok suşlarında antibiyotik direnci, *ANKEM Derg*, (Kongre sunum özeti), 13, 2, 104.
- Moellering JC (2000). *Enterococcus* Species. In Mandell GL, et al. Principles and Practise of Infectious Diseases 5th Ed. New York: Churcill Livingstone, pp: 2147-2156.
- Moellering RC (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis*, 14, 1173-1178.
- Moellering RC (2005). *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed., New York. Churchill Livingstone, pp: 2411-2421.
- Murray BE (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, 3, 46-65.
- Murray BE (1998). Diversity among multidrug resistant *Enterococcus*. *Emerg Infect Dis*, 1, 37-47.
- Murray BE (2000). Vancomycine resistant enterococccal infections. *N Eng J Med*, 342, 710-721.
- Nourse C, Murphy H, Byrne C (1998). Control of a nosocomial outbreak of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric oncology unit: risk factors for colonisation. *Eur J Pediatr*, 157, 20-27.
- Özseven AG, Sesli Çetin E, Cicioğlu Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 25, 4, 256-262.
- Patterson JE (2000). New Gram positive agents in nosocomial infection. *Curr Opin Infect Dis*, 13, 6, 593-598.
- Patterson JE, Sweeney AH, Simms M (1995). An analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility and outcome. *Medicine*, 74, 4, 191-200.

- Pesce A, Debbia E A, Toni M, Schito GC (1992). Antibiotic resistance of isolates of *Enterococcus* in Italy. *Clin Infect Dis*, 15, 3, 490-494.
- Riboldi GP, de Mattos EP, Frazzon APG, d'Azevedo PA, Frazzon J (2008). Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil, *J Basic Microbiol*, 48, 31-37.
- Rodrigues J, Poeta P, Martins A, Costa D (2002). The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin. *J Vet Med B*, 49, 6, 278-280.
- Ruhi MZ, Aysev D, Aksu G (1997). AÜTF Çocuk Hastalıkları Kliniğinde izole edilen enterokok suşlarının türlere göre dağılımı ve antimikrobiklere direnç durumu. 8. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Özet Kitabı*, İstanbul, s: 154.
- Ruoff KL, Maza L, Murtagh MS (1990). Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 28, 435-437.
- Sahm D (2009). *In vitro* activity of doripenem. *Clin Infect Dis*, 49, Suppl. 1, 11-16.
- Schouten MA, Vose A, Hoogkamp-Karstanje JAA (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Ch*, 43, 10, 2542-2546.
- Shepard BD, Gilmore MS (2002). Antibiotic resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect*, 4, 215-224.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev*, 19, 512-530.
- Söyletir G, Çerikçioğlu N (2002). Streptokok enfeksiyonları. In Willke TA, Söyletir G, Doganay M (eds): *Enfeksiyon Hastalıkları*. İkinci baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, pp: 1467-1497.
- Spelman DW (2002). Hospital-acquired infections. *MJA Practice Essentials*, 176, 286-291.
- Strausbaugh LJ, Gilmore MS (2000). Enterococcal Infections. In: Stevens DL, Kaplan EL, eds. *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis*. New York, NY: Oxford University Press, 280-301.
- Sümerkan B (2001). Vankomisine duyarlı enterokoklar 2. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Hastane Enfeksiyonları Kongresi (25-28 Nisan 2001, Samsun), Kongre Özet Kitabı, s: 187-191.
- Şirin MC, Adıloğlu AK (2011). Comparison of five antimicrobial susceptibility tests in detecting high level aminoglycoside and vancomycin resistances in hospital acquired enterococcus isolates. *Clin Lab*, 57, 3-4, 157-162.
- Teixeira LM, Facklam RR (2003). Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition, Washington. ASM Press, Washington DC. pp: 422-433.
- Teixeira LM, Siqueira-Carvalho MG, Facklam RR. Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC. pp: 430-442.

- Türkdağı H, Arslan U, Tuncer Eİ (2011). Kan kültürlerinden izole edilen enterokoklarda antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 41, 3, 103-106.
- Udo EE, Al-Sweih N, Philips OA, Chugh TD (2003). Species prevalence and antibacterial resistance of enterococci isolated in Kuwait hospitals. *J Med Microbiol*, 52, 163-168.
- Ulusoy S (1999). Dirençli Gram pozitif bakteri infeksiyonları. *Hast Inf Derg*, 3, 212-221.
- Ulusoy S, Hoşgör M, Özakan F, Özinel MA, Tokbaş A (1995). Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium'un antibiyotik direncinin araştırılması. *Ankem Derg*, 9, 1, 12-16.
- Unat EK (1986). Gram Pozitif Koklar, Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi, 2.Baskı. İstanbul: Emek Matbaacılık, s: 429-480.
- Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL (2009). Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol*, 27, 301-305.
- Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara. s: 81-108,
- Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC (1988). Vancomycin resistant enterococci, *Lancet*, 1, 57-58.
- Ünlü M, Vardar Ünlü G, Bakıcı MZ, Şahin A (2002). Klinik örneklerden soyutlanan Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere direnci. *İnfeksiyon Derg*, 16, 4, 471-475.
- Vural DG, Temiz H, Aktar GS, Onur A, Ayaydın Z, Turhanoglu M, Vural H (2014). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları, 29.Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Bodrum, 28-31 Mayıs 2014, *ANKEM Derg*, 28 , Ek 1, 26.
- Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, Ünal S, Kocagöz S, Mutlu G (1999). Vankomisine dirençli Enterococcus faecium suşu. *Ankem Derg*, 13, 1, 1-4.
- Watts JL, Salmon SA, Yancey JR, Nickerson SC, Weaver LJ, Holmberg C, Pankey JW, Fox LK (1995). Antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from the mammary of dairy heifers. *J Dairy Sci*, 78, 1637-1648.
- Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology. Baltimore Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 6th ed., pp: 640- 643.
- Winn WC, Koneman EW, Allen SD, Procop GW, Schreckenberger PC, Janda WM, Woods GL (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.
- Yavuz MT, Şahin İ, Öztürk E, Behçet M, Kaya D (2006). Hastane kökenli üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen Enterococcus türlerinin insidansı ve antibiyotik direnç profilleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 36, 4, 195-199.
- Yazgı H, Ertek M, Uslu H, Kadanalı A, (2003). Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci ile beta laktamaz üretimi ilişkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 33, 4, 333-336.

Yıldırım M (2007). Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Düzce Üniv Tıp Fak Derg*, 2, 46-52.

Zouain MG, Araj GF (2001). Antimicrobial resistance of enterococci in Lebanon. *Int J Antimicrob Agents*, 17, 3, 209-213.

ÖZGEÇMİŞ

Gülşah TOLLU, 1987 yılında Kahramanmaraş'ın Afşin ilçesinde doğdu. İlk ve ortaöğrenimini burada tamamladı. 2006 yılında Niğde Üniversitesi, Niğde Sağlık Yüksekokulu Ebelik bölümüne başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2011 Yılında Sağlık Bakanlığı'na bağlı ikinci basamak Van Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi'ne atandı. 2012 Yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı. 2014 yılında Mersin Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinde çalışmaya başladı. Halen aynı hastanede görev yapmaktadır.

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : B.30.2.YYU.0.01.00.00/465

Tarih: 22./10/ 2013

Konu :Etik kurul Karar Yazısı

Sn. Yrd.Doç.Dr.İsmail Hakkı EKİN

“İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının biyotiplendirmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması” ve “İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* Isı Şok Proteinlerinin Araştırılması” isimli çalışmalarınıza ait etik kurul kararları ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Doç. Dr. Oğuz TUNCER
Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

EKİ:

Karar Yazısı (2 Adet)

Adres: 65080 Zeve Kampüsü - VAN **Tel :** (0432) 2150470 **E-Posta:** etikkurull@gmail.com
Fax : (0432) 2168352 **Web:** <http://www.yyu.edu.tr>

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURUL KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole edilen <i>Enterococcus faecalis</i> ve <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının biyotiplendirmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlıklarının araştırılması			
	VARSA ARAŞTIRMA PROTOKOL/PLAN KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.İsmail Hakkı EKİN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Veteriner Fakültesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	Yok			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Yok			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Analitik			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılacak çalışma, Hemşirelik faaliyetlerinin sınırları içerisinde yapılacak araştırma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	10.09.2013		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	20.09.2013		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☒	IKU Taahhütnamesi, Mali Taahhütname, Çıkar İlişkisi Olmadığına Dair Belge, İmzalı Özgeçmiş, Helsinki Bildirgesi		

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURUL KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:14	Tarih: 11.09.2013
	Yrd.Doç.Dr. İsmail Hakkı EKİN sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda bilgileri verilen “İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole edilen Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium suşlarının biyotiplendirmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması” isimli klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç.Dr. Oğuz TUNCER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç.Dr. Oğuz TUNCER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr. Şükran SEVİMLİ	Tıp Tarihi ve Etik	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Sıddık KESKİN	İstatistik Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Mertihan KURDOĞLU	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. H.Ali GÜMRÜKÇÜOĞLU	Kardiyoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Ufuk ÇOBANOĞLU	Göğüs Cerrahi	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. İlhan GEÇİT	Üroloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr. Servet KAVAK	Biyofizik Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr. Bilal ÇEĞİN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç.Dr. Hüseyin BEĞENİK	Dahiliye	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç.Dr. Fatih GARÇA	KBB	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr. Ersoy ÖKSÜZ	Farmakoloji Uzmanı	Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Fatma PEKER	Hukuk	Van İl özel İdaresi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Çiğdem ÖNER	Üniversite Mezunı	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Toplantıda Bulunma

Ek-2: Hasta Onam Formu

VAN BÖLGE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ **ARAŞTIRMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU**

Sayın hasta veya

Lütfen, elinize verilen bu belgeyi dikkatlice okuyunuz. Araştırma ile ilgili detaylı bilgi belgede var olmakla birlikte sözlü olarak da verilecektir. Bu belgede haklarınız, araştırmanın yararları ve riskleri konusunda detaylı bilgi yer almaktadır. Bu açıklamaların amacı sağlığınız ile ilgili konularda sizi bilgilendirmek ve bu süreçte sizi daha bilinçli bir biçimde ortak etmektir. Lütfen, anlamadığınız hususları belirtin. **Araştırmamıza katıldığınız için teşekkür ederiz.**

Araştırmanın adı: Gaita ve idrar örneklerinden izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının tiplendirilmesi ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması.

Araştırmanın konusu, amacı, kullanılacak yöntem, süre ve süreci:

Araştırmamız **MİKROBİYOLOJİ** konusu hakkındadır. Araştırmada **İdrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan bazı bakterilerden olan Enterokokların biyokimyasal ve moleküler tiplendirilmeleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları hakkında daha detaylı bilgi sahibi olunması amaçlanmaktadır.**

Araştırmayla ilgili önerilen işlem /süreç:

☒ Araştırmamız için önerdiğimiz işlem/süreç: Kişilere verilen kaba idrar örneğini vermesi

☐

☐

Araştırma sırasında oluşabilecek zararlar veya olası riskler:

☒ Araştırmamızın riski yoktur

☐

☐

Araştırma sırasında oluşabilecek araştırmaya özel riskler:

☒ Araştırmamızın riski yoktur

☐

☐

Araştırmanın sağlayacağı olası yararlar:

Araştırmamız size/ topluma şu yararları sunacaktır.

☐ İdrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan bakterilerin (Enterokokların) biyokimyasal ve moleküler tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılığı hakkında bilgi sağlanacaktır

☐

☐

Anestezi:

Araştırmada herhangi bir tıbbi girişimde bulunulmayacaktır.

Araştırmanın finansı:

BU ARAŞTIRMAYA KATILDIĞINIZ İÇİN SİZDEN EK BİR ÜCRET TALEP EDİLMEYECEK VE SİZE HERHANGİ BİR ÖDEME DE YAPILMAYACAKTIR.

Sayın hasta/ katılımcı/....., lütfen, aşağıda yer alan yazıları dikkatle okuyunuz ve ilgili boşluğu doldurun ya da ilgili kutucuğu işaretleyin.

- Araştırma ile ilgili açık ve sade bir ifade ile anlatılan ön bilgileri aldıktan ve elimdeki olur formunu okuduktan sonra araştırmaya davet edildim. Söz konusu daveti;
☐ **Kabul ettim.** ☐ **Kabul etmedim.**
- Araştırmada dikkat edilecek hususları okudum ve dinledim. Araştırma ile ilgili aklıma takılan sorularımı sordum. Gereken aydınlatıcı cevapları
☐ **Aldım, anladım.** ☐ **Almadım, anlamadım.**
- Kimliğimin gizli tutulması ve yalnızca eğitim ve araştırma amaçlı kullanılması koşulu ile bana uygulanacak girişim/tedavi sırasında fotoğraf çekilmesine ya da kayıt yapılmasına;
☐ **Onay veriyorum** ☐ **Onay vermiyorum.**
- Tanısal girişimlerin, tıbbi ve cerrahi tedavilerin yararlarını ve olası risklerini öğrendim, yapılacak işlemleri
☐ **Kabul ediyorum** ☐ **Kabul etmiyorum**
- Araştırma bilgilendirme sürecine okuma/yazmam olmadığı veya tek başıma karar vermek istemediğim için katıldım.
- Araştırma ile ilgili tarafımdan alınan verilerin gizli tutulacağını,
☐ **Biliyorum** ☐ **Bilmiyorum**
- Araştırmadan istediğim zaman çekilme hakkımın olduğunu,
☐ **Biliyorum** ☐ **Bilmiyorum**
- Araştırma sonucunda herhangi ücret almayacağımı/vermeyeceğimi;
☐ **Biliyorum** ☐ **Bilmiyorum**
- Tıbbi bir risk ortaya çıkarsa ücretsiz tıbbi tedavi yapılacağını
☐ **Biliyorum** ☐ **Bilmiyorum**
- Araştırma sonucunun olası faydaları konusunda detaylı
☐ **Biliyorum** ☐ **Bilmiyorum**

Tarih: / /

Katılımcının

Adı-Soyadı :
Doğum Tarihi :
Adresi :
.....
Tel. No :

Sorumlu Araştırmacının

Adı-Soyadı :
Kurum Sicil No :
İmza :

Acil Durumlarda Olur Alınacak Yasal

Temsilcisinin

Adı-Soyadı :
Adresi :
.....
Tel. No :

**Kanuni yeterliliği olmayan hastalar için veli /
vasinin**

Adı-Soyadı :
Adresi :
.....
Tel. No :