



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



Doktora Tezi

**DENİZ SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN İNCELENMESİ**

İpek ADA

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayten KİMİRAN**

Temmuz, 2019

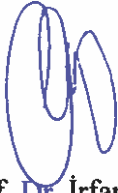
İSTANBUL

Bu çalışma, 22.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Ayten KİMİRAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ
Gebze Teknik Üniversitesi
Temel Bilimler Fakültesi



Doç. Dr. Zuhale ZEYBEK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25252 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca akademik görüş ve fikirleri ile bana yol göstererek hep yanımda olan, değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Doktora tez sürecim boyunca ara raporlarımda değerli yorumları ile katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN ve Sayın Prof. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER hocalarıma,

Güleryüzlülüğü, akademik başarısı ve pozitif enerjisiyle ışık tutan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Zuhal ZEYBEK'e,

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU ve tüm asistan hocalarıma, meslektaşlarım Yüksek Lisans Öğrencisi Hazal ZORBOZAN ve Nil KAYA'ya,

Doktora tez çalışmam boyunca teknik ve manevi destekleri ile yanımda olan Altınbaş Üniversitesi Rektör Yardımcısı ve aynı zamanda Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Müdürü olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Turgut İPEK ve Altınbaş Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Program Başkanı Sayın Öğr. Üyesi Dr. Şükriye KARADAYI ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma,

Doktora sürecim boyunca 2211A Genel Yurtiçi Doktora Bursu olarak maddi destekte bulunan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na

Manevi desteği, bitmek bilmeyen hayat enerjisi, azmi ve başarıları ile akademik hayatımda her daim örnek olan Sayın Op. Dr. Levent Bayraktar hocama,

Bilim ışığı yolunda yılmadan azimle yürüyen tüm sevgili biyologlara,

Sadece hayatın sunduğu mutluluk rüzgarında değil zorlu yollarında, yokuşlarda ve uçurumlarda da her daim elimi tutarak bugünlere gelmemi sağlayan, emekleri ve sevgisi ile desteklerini esirgemeyen canımdan çok sevdiğim annem İsmet ADA ve canım anneannem Fikriye ÇOBAN'a,

Sonsuz ışığıyla her daim anımsadığım, yanımda hissettiğim, bu günlere gelmemi hayal eden, kalbimde sonsuza dek yer alacak olan güzel anılarımin kahramanı çocukluğum, çınarım, masumiyetim, gökyüzümü aydınlatan sonsuzluğa uğurladığım rahmetli biricik babam MUHİTTİN ADA'ya,

Tüm kalbimle teşekkür ederim..

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ.....	xvi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xx
ÖZET	xxiv
SUMMARY	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ENTEROKOK CİNSİ BAKTERİLER.....	3
2.1.1. Enterokokların Sınıflandırılması ve Tarihçesi.....	3
2.1.2. Enterokok Cinsi Bakterilerin Fenotipik Özellikleri.....	6
2.1.3. Enterokokların Epidemiyolojisi.....	7
2.2. ENTEROKOK CİNSİ BAKTERİLERİN PATOGENEZİ.....	8
2.2.1. Enterokok Cinsi Bakterilerin Neden Olduğu Enfeksiyonlar	8
2.2.2. Enterokok Genomu ve Genetik Bilgi Transferi.....	9
2.3. ENTEROKOK CİNSİ BAKTERİLERİN VİRULANS FAKTÖRLERİ	10
2.3.1. Konak Dokulara Tutunma	12
2.3.1.1. Agregasyon Faktörü.....	12
2.3.1.2. Enterokok Ekstrasellüler Yüzey Proteini.....	13
2.3.1.3. Kollajen Bağlayıcı Adhezin.....	14
2.3.1.4. <i>Enterococcus faecalis</i> Antijen A Proteini (EfaA Proteini).....	15
2.3.2. Biyofilm Oluşumu	15
2.3.2.1. <i>BopD</i> (Biyofilm Oluşumu).....	16
2.3.2.2. <i>Fsr</i> (<i>E. faecalis</i> Regülatörü).....	17
2.3.2.3. <i>Ebp</i> (Endokardit Biyofilm İlişkili Pilus).....	17
2.3.2.4. <i>SrtC</i> (SortazC).....	17
2.3.2.5. <i>Sal</i> (Secretory Antigen Like)	17

2.3.2.6.	<i>Epa (Enterokokkal Polisakkarit Antijen)</i>	17
2.3.2.7.	<i>DltA (D-alanine-D-alanil Taşıyıcı Protein Ligaz)</i>	17
2.3.3.	Konak Savunma Mekanizmalarını Önleme	18
2.3.3.1.	<i>Lipoteikoik Asit (LTA)</i>	18
2.3.3.2.	<i>Ekstrasellüler Süperoksit</i>	18
2.3.3.3.	<i>Enterokok Bakteriyosinleri</i>	18
2.3.4.	Konak İmmun Kaçışta Rol Oynayan Bakteri Hücre Komponenti	20
2.3.4.1.	<i>Kapsül Polisakkarit Antijenleri</i>	20
2.3.5.	Sahip Olduğu Enzimler	20
2.3.5.1.	<i>Hemolizin/Sitolizin</i>	20
2.3.5.2.	<i>Jelatinaz</i>	22
2.3.5.3.	<i>Hiyaluronidaz</i>	23
2.3.6.	Seks Feromonları	23
2.4.	ENTEROKOKLARDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI	24
2.4.1.	β -laktam Direnci	26
2.4.2.	Aminoglikozit Direnci	27
2.4.3.	Trimetoprim-Sulfametoksazol (TMP-SMX) Direnci	28
2.4.4.	Linkozamidlere Direnç	29
2.4.5.	Kinupristin/dalfopristin Direnci	29
2.4.6.	Glikopeptit Direnci	29
2.4.7.	Kloramfenikole Direnç	32
2.4.8.	Makrolidlere Direnç	32
2.4.9.	Tetrasiklinlere Direnç	33
2.4.10.	Florokinonlara Direnç	33
3.	MALZEME VE YÖNTEM	34
3.1.	DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER	34
3.2.	ENTEROKOK SUŞLARININ API [®] 20 STREP TEST KİTİ İLE TANIMLANMASI	34
3.3.	ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ	35
3.3.1.	Antibiyotik Duyarlılık/Dirençlilik Profillerinin İncelenmesi	35
3.3.1.1.	<i>Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması</i>	35
3.3.1.2.	<i>Kullanılan Antibiyotikler</i>	35
3.3.1.3.	<i>Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri</i>	36
3.3.2.	Hemoliz Aktivitesinin İncelenmesi	36

3.3.3.	Jelatinaz Aktivitesinin İncelenmesi	37
3.3.4.	Kazeinaz Aktivitesinin İncelenmesi	37
3.3.5.	Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin İncelenmesi	37
3.3.6.	Serum Duyarlılıklarının İncelenmesi	39
3.3.6.1.	<i>Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması</i>	39
3.3.6.2.	<i>İnsan Serumunun Hazırlanması</i>	39
3.3.6.3.	<i>Serum Duyarlılık Deneyleri</i>	39
3.3.7.	Hemaglutinasyon Aktivitesinin Belirlenmesi.....	40
3.3.8.	Enterokok Suşlarının Bakteriyosin Üretimi Aktivitesinin İncelenmesi	40
3.4.	ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN GENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ	42
3.4.1.	Kromozomal DNA İzolasyonu.....	42
3.4.1.1.	<i>Kromozomal DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi</i>	43
3.4.2.	Plazmit DNA İzolasyonu.....	45
3.4.2.1.	<i>Plazmit DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi</i>	46
3.4.2.2.	<i>Plazmit Profil Büyüklüklerinin Belirlenmesi</i>	46
3.4.3.	Virulans Faktörlerinin Genotipik Olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile İncelenmesi	48
3.4.3.1.	<i>Antibiyotik Direnç ve Virulans Genlerini Tespit Etmek için Kullanılan Primerler</i>	48
3.4.3.2.	<i>PZR Yöntemi</i>	51
3.4.3.3.	<i>Antibiyotik Direnç ve Virulans Genlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi</i>	55
3.5.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	55
3.6.	ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....	56
3.6.1.	Bile Esculin Agar Besiyeri (Oxoid, UK).....	56
3.6.2.	Beyin Kalp İnfüzyon Agar Besiyeri (Merck, Germany)	57
3.6.3.	Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri (Merck, Germany)	57
3.6.4.	%0.8'lik Agar Bulunan Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri.....	58
3.6.5.	%4 Jelatin İçeren Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri	58
3.6.6.	Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri (Merck, Germany)	58
3.6.7.	Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri (Merck, Germany)	59
3.6.8.	Nutrient Agar Besiyeri (Oxoid, UK)	60
3.6.9.	Mueller-Hinton Agar (MHA) Besiyeri (Oxoid, UK)	60
3.6.10.	%3 Skim-milk Powder İçeren Mueller Hinton Agar (MHA) Besiyeri	61

3.6.11.	%5 Koyun Kanlı Columbia Agar Besiyeri (Becton Dickinson, Germany).....	61
3.6.12.	M17 Agar Besiyeri (Himedia, India).....	62
3.6.13.	Todd-Hewitt Broth (THB) Besiyeri (Sigma, US)	63
3.6.14.	Çalışmada Kullanılan Eritrositlerin Eldesi	63
3.6.15.	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS)	64
3.6.16.	McFarland No. 0.5 Bulanıklık Serisinin Hazırlanması	64
3.6.17.	McFarland No. 1 Bulanıklık Serisinin Hazırlanması	64
3.6.18.	McFarland No. 4 Bulanıklık Serisinin Hazırlanması	65
3.6.19.	1M Tris-HCl Hazırlanışı.....	65
3.6.20.	0.5 M EDTA Hazırlanışı	65
3.6.21.	Tris-EDTA Hazırlanışı	65
3.6.22.	1M HCl Hazırlanışı	66
3.6.23.	10M NaOH Hazırlanışı.....	66
3.6.24.	10x TAE Hazırlanışı.....	66
3.6.25.	1x TAE Hazırlanışı.....	67
3.6.26.	%1'lik Agaroz Jel Hazırlanışı.....	67
3.6.27.	%1'lik Kristal Viyole Boyasının Hazırlanışı.....	67
3.6.28.	%95'lik Etanol Hazırlanışı	67
3.6.29.	%96'lık Etanol Hazırlanışı	67
3.6.30.	%35 Gliserol Hazırlanışı	68
3.6.31.	Lizozim Solüsyonu Hazırlanışı	68
3.6.32.	IDPURE™ Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit İçeriği Hazırlanışı.....	68
3.6.33.	Antibiyotik Direnç Genlerini Belirlemede Kullanılan Primer Setlerinin Hazırlanışı.....	69
3.6.34.	Virulans Genlerini Belirlemede Kullanılan Primer Setlerinin Hazırlanışı.....	70
4.	BULGULAR.....	71
4.1.	ENTEROKOK SUŞLARININ API®20 STREP TEST KİTİ İLE TANIMLANMASI.....	71
4.2.	ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ.....	73
4.2.1.	Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi.....	73
4.2.2.	Hemoliz Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	81
4.2.3.	Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	83
4.2.4.	Kazeinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	84
4.2.5.	Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Değerlendirilmesi	86

4.2.6.	Serum Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi	88
4.2.7.	Hemaglutinasyon Aktivitesinin Değerlendirilmesi	90
4.2.8.	Bakteriyosin Aktivitesinin Değerlendirilmesi	92
4.3.	ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK OLARAK GENEL DEĞERLENDİRMESİ	96
4.4.	ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN GENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ	101
4.4.1.	DNA Eldesi	101
4.4.2.	Antibiyotik Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Gösterilmesi	102
4.4.2.1.	<i>Vankomisin Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	103
4.4.2.2.	<i>Streptomisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	105
4.4.2.3.	<i>Gentamisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	106
4.4.2.4.	<i>Kanamisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	108
4.4.2.5.	<i>Rifampisin Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	109
4.4.2.6.	<i>Ampisilin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	111
4.4.2.7.	<i>Eritromisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	113
4.4.2.8.	<i>Kloramfenikol Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	114
4.4.2.9.	<i>Tetrasiklin Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	116
4.5.	ENTEROKOK SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN GENOTİPİK OLARAK GENEL DEĞERLENDİRMESİ	118
4.5.1.	Enterokok Suşlarında Virulans Faktörlerini Kodlayan Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Gösterilmesi	123
4.5.1.1.	<i>Hücre Dışı Matriks Proteinlerine Bağlanmayı İfade Eden ace Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	123
4.5.1.2.	<i>Jelatinaz Aktivitesini Kodlayan gelE Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	124
4.5.1.3.	<i>Yüzey Proteini Varlığını İfade Eden esp Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	126
4.5.1.4.	<i>Sitolizin Üretimini İfade Eden cylM, cylB ve cylA Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	127
4.5.1.5.	<i>Enterokok Suşlarında Adezyon proteini Varlığını İfade Eden efaAfs ve efaAfm Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi</i>	129

4.5.1.6. Seks Feromonunu İfade Eden <i>cpd</i> , <i>ccf</i> ve <i>cob</i> Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi.....	132
4.5.1.7. Agregasyon Faktörünü İfade Eden <i>agg</i> Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi.....	134
4.5.1.8. Jelatinaz ve Serin Proteazın İfadesini Düzenleyen <i>fsr</i> Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi.....	136
4.6. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS GENLERİNİN GENOTİPİK OLARAK GENEL DEĞERLENDİRMESİ.....	137
4.7. ENTEROKOK SUŞLARINDA PLAZMİT PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ.....	146
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	149
KAYNAKLAR.....	170
ÖZGEÇMİŞ	189

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Enterokok cinsinin 16S rRNA dizi analizi özelliklerine göre hazırlanan filogenetik dendrogram (Klein, 2003).4
- Şekil 2.2:** Enterokok türlerinin biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanma şeması (Akçimen, 2010).6
- Şekil 2.3:** Enterokok cinsi bakterilerde virulans faktörleri (Çetinel Aksoy, 2008).12
- Şekil 2.4:** Biyofilm oluşum aşamaları (Stoodley ve diğ., 2002).16
- Şekil 2.5:** Enterokoklarda sitolizin üretimi. **A:** *cyLL* ve *cyLS* tarafından kodlanan toksin yapılı bileşikler [*CylL* (büyük alt ünite) ve *CylS* (küçük alt ünite)], **B:** Sitolizin alt ünitelerini oluşturan *CylL* ve *CylS* yapısı (Gilmore ve diğ., 1990; Haas ve diğ., 2002).22
- Şekil 2.6:** Virulans faktörlerinin seks feromonu ile aktarımı (Kayaoglu ve Orstavik, 2004).24
- Şekil 2.7:** Enterokoklarda vankomisin direnci. **IR_L** ve **IR_R**: sol ve sağ inverted tekrarları, **B:** *Bam*HI; **Bg:** *Bg*III, **EI:** *Eco*RI, **EV:** *Eco*RV, **H:** *Hind*III, **P:** *Pst*I, **X:** *Xba*I restriksiyon enzimi kesim bölgeleri (Fang ve diğ., 2010).30
- Şekil 3.1:** 20 mikrotüpten oluşan API[®]20 Strep (Biomeriux, France) test sistemi.35
- Şekil 3.2:** Enterokok cinsi bakterilerin bakteriyosin üretim aktivite şeması.41
- Şekil 3.3:** Çalışmada kullanılan yatay agaroz jel elektroforezi (Clever, Scientific).43
- Şekil 3.4:** Çalışmada kullanılan DNA Markerlar. **A:** 50 bp DNA Ladder (Sigma), **B:** 100 bp DNA Ladder (Biomatik), **C:** 1 kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific[™], Generuler).44
- Şekil 3.5:** Çalışmada kullanılan kameralı jel görüntüleme sistemi (Daihan, Wisedoc).45
- Şekil 4.1:** **A:** Enterokok suşlarına ait Bile Esculin Agar besiyeri üzerindeki koloni morfolojisi görüntüleri (AE12 ve AE13 suşu), **B:** Enterokok suşuna ait Gram boyama görüntüsü (100x büyütme).71
- Şekil 4.2:** Enterokok suşlarının API[®]20 Strep test kiti identifikasyon sonuçları. **A:** Pozitif kontrol *E. faecalis* ATCC 29212 suşu, **B:** AE1, **C:** AE48, **D:** AE66.72

- Şekil 4.3:** Enterokok suşlarının antibiyotik diskleri etrafında oluşturduğu inhibisyon zonları. **a:** AM(10), E(15) ve RIF(5); **b:** AK(30), K(30) ve CN(10); **c:** VA(10), TE(30) ve C(30); **d:** AM(10), P(10) ve NA(30); **e:** S(10), P(10) ve NA(30) antibiyotiklerine karşı oluşturduğu zon görüntüsü. AK(30): Amikasin, AM(10): Ampisilin, C (30): Kloramfenikol, CN(10): Gentamisin, E(15): Eritromisin, K(30): Kanamisin, NA (30): Nalidiksik asit, P(10): Penisilin, RIF(5): Rifampisin, S(10): Streptomisin, TE(30): Tetrasiklin, VA(10): Vankomisin.....76
- Şekil 4.4:** %5 koyun kanı içeren Columbia Agar besiyerinde β -hemoliz. **A:** *E. faecalis* ATCC 29212, **B:** AE1 Enterokok suşu.81
- Şekil 4.5:** Enterokok suşlarına ait jelatinaz aktivite görüntüleri. **A:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212), **B:** AE45 Enterokok suşu (jelatinaz +), **C:** AE62 Enterokok suşu (jelatinaz -).....83
- Şekil 4.6:** Enterokok suşlarına ait kazeinaz aktivitesi görünüşleri. **A:** AE1 (kazeinaz +), **B:** AE13 (kazeinaz -), **C:** Pozitif kontrol (*Bacillus subtilis*), **D:** Negatif kontrol (*Escherichia coli*).84
- Şekil 4.7:** Biyofilm oluşum deneyinde kullanılan 96 kuyucuklu polistren mikropleyt. **A1-A12:** AE1-AE12; **B1-B12 sırası:** AE13-AE24; **C1-C12 sırası:** AE25-AE36; **D1-D12:** AE37-AE48; **E1-E12:** AE49-AE60; **F1-F6:** AE61-AE66; **H1:** Negatif kontrol; **H12:** Pozitif kontrol (*E.faecalis* ATCC 29212).....86
- Şekil 4.8:** Enterokok suşlarının hemagglütinasyon reaksiyonları.90
- Şekil 4.9:** M17 Agar besiyeri üzerinde, Enterokok bakterilerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin üretme yeteneği. **A:** Bakteriyosin üretimi pozitif (zon ≥ 2 mm), **B:** Bakteriyosin negatif (zon oluşumu yok).93
- Şekil 4.10:** M17 Agar besiyeri üzerinde, Enterokok bakterilerinin *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretme yeteneği. **A:** Bakteriyosin üretimi pozitif (zon ≥ 2 mm), **B:** Bakteriyosin negatif (zon oluşumu yok).....93
- Şekil 4.11:** Enterokok suşlarına ait kromozomal DNA'ların elektroforez görüntüleri. **1, 2, 21, 40, 41, 56, 73 ve 86:** 1kb plus DNA Ladder; **3, 22, 42, 58 ve 74:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **4-19, 29-38, 43-54, 59-60:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **61-83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **20, 39, 55, 71 ve 85:** Negatif kontrol.102
- Şekil 4.12:** Enterokok suşlarının vankomisin direnç genlerine (*vanA* ve *vanB*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 100 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol. **A:** *vanA*; **B:** *vanB*.103
- Şekil 4.13:** Enterokok suşlarının streptomisin direnç genine (*ant(6)-la*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38,**

- 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.....105
- Şekil 4.14:** Enterokok suşlarının gentamisin direnç genine (*acc(6')-aph(2'')*) ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.107
- Şekil 4.15:** Enterokok suşlarının kanamisin direnç genine (*aphA-3*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.....108
- Şekil 4.16:** Enterokok suşlarının rifampisin direnç genlerine (*rpoB1* ve *rpoB*) ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol; **A:** *rpoB1*; **B:** *rpoB2*.....110
- Şekil 4.17:** Enterokok suşlarının ampisilin direnç genine (*bla(Z)*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.112
- Şekil 4.18:** Enterokok suşlarının eritromisin direnç genine (*ermB*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.113
- Şekil 4.19:** Enterokok suşlarının kloramfenikol direnç genine (*catpIP*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.115
- Şekil 4.20:** Enterokok suşlarının tetrasiklin direnç genlerine (*tetM* ve *tetL*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol; **A:** *tetM*; **B:** *tetL*.....116
- Şekil 4.21:** Enterokok suşlarında *ace* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:**

- AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol.123
- Şekil 4.22:** Enterokok suşlarında *gelE* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol.125
- Şekil 4.23:** Enterokok suşlarında *esp* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol.126
- Şekil 4.24:** Enterokok suşlarında *cylM*, *cylB* ve *cylA* virulans genlerine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol. **A: cylM; B: cylB; C: cylA**.....128
- Şekil 4.25:** Enterokok suşlarında *efaAfs* ve *efaAfm* virulans genlerine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol. **A: efaAfs; B: efaAfm**.....130
- Şekil 4.26:** Enterokok suşlarında *cpd*, *ccf* ve *cob* virulans genlerine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol. **A: cpd; B: ccf; C: cob**.133
- Şekil 4.27:** Enterokok suşlarında *agg* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 100 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol.135
- Şekil 4.28:** Enterokok suşlarında *fsr* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81**: 1 kb plus DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82**: Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56**: AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83**: AE47-AE65 (*E. faecium*); **84**: AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85**: Negatif kontrol.136
- Şekil 4.29:** Enterokok suşlarında plazmit DNA bantlarının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi. **1, 20**: λ DNA Marker, **2**: Standart suş (*E. faecalis* ATCC 29212),

3: AE5, **4:** AE16, **5:** AE18, **6:** AE20, **7:** AE21, **8:**AE23, **9:** AE24, **10:** AE25, **11:** AE28; **12:** AE31; **13:** AE36; **14:** AE38; **15:** AE43; **16:** AE50, **17:** AE54; **18:** AE63; **19:** Negatif kontrol.....146



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Enterokokları diğer Gram pozitif koklardan ayıran özellikler (Facklam ve Sahm, 1995; Facklam ve Teixeira, 1998).....	3
Tablo 2.2: Enterokokların biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması (Lehman, 2011).....	6
Tablo 2.3: <i>Enterococcus</i> cinsinde tanımlanan virulans faktörleri ve virulanstan sorumlu genler (Kariyama ve diğ., 2000; Mundy ve diğ., 2000; Eaton ve Gasson, 2001; Shankar ve diğ., 2002; Toledo-Aran ve diğ., 2001).....	11
Tablo 2.4: Enterokokların ürettiği bakteriyosinler (enterosinler).....	19
Tablo 2.5: Enterokokların intrinsik ve ekstrinsik dirençli olduğu antibiyotikler (Robert ve Moellering, 2005).	26
Tablo 2.6: Enterokok vankomisin direnç tipleri (Gilmore, 2002; Fisher ve Phillips, 2009; Yüksel, 2012).	32
Tablo 3.1: CLSI verilerine göre direnç profili.....	36
Tablo 3.2: Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi.	38
Tablo 3.3: Enterokok suşlarının serum duyarlılıklarının değerlendirilmesi.	40
Tablo 3.4: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerini tespit etmek için kullanılan primerler.	49
Tablo 3.5: Enterokok suşlarında virulans genlerini tespit etmek için kullanılan primerler.	50
Tablo 3.6: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç ve virulans genlerini tespit etmek için hazırlanan PZR karışımı.	51
Tablo 3.7: <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>acc(6')-aph(2'')</i> , <i>aphA-3</i> , <i>rpoB1</i> , <i>rpoB2</i> , <i>bla(Z)</i> , <i>ermB</i> , <i>catpIP</i> , <i>tetM</i> ve <i>tetL</i> antibiyotik direnç genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.....	52
Tablo 3.8: <i>ace</i> , <i>gelE</i> , <i>efaAfm</i> , <i>efaAfs</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>cylA</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> ve <i>fsr</i> virulans genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.	54
Tablo 3.9: McFarland No. 0.5, McFarland No.1 ve McFarland No.4 bulanıklık serisinin hazırlanması.	65

Tablo 3.10: Antibiyotik direnç gen bölgelerini belirlemede kullanılan primerler ve 100 µM stok primer seti hazırlamada kullanılan TE Buffer hacmi (µl).....	69
Tablo 3.11: Virulans gen bölgelerini belirlemede kullanılan primerler ve 100 µM stok primer seti hazırlamada kullanılan TE Buffer hacmi (µl).	70
Tablo 4.1: İzole edilen Enterokok suşlarının API®20 Strep test kiti ile tür dağılımı.	72
Tablo 4.2: Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.	73
Tablo 4.3: Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları.	75
Tablo 4.4: Enterokok suşlarının antibiyotik direnç profilleri.	78
Tablo 4.5: Enterokok suşlarının çoklu antibiyotik direnci.	80
Tablo 4.6: Enterokok suşlarının hemoliz aktiviteleri.	82
Tablo 4.7: Enterokok suşlarının jelatinaz aktiviteleri.	83
Tablo 4.8: Enterokok suşlarının jelatinaz aktivitesi oranları.	84
Tablo 4.9: Enterokok suşlarının kazeinaz aktiviteleri.	85
Tablo 4.10: Enterokok suşlarının kazeinaz aktivitesi oranları.....	85
Tablo 4.11: Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri.	87
Tablo 4.12: Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri.	88
Tablo 4.13: Enterokok suşlarının serum duyarlılıkları.	89
Tablo 4.14: Enterokok suşlarının serum duyarlılık oranları.	90
Tablo 4.15: Enterokok suşlarının hemaglutinasyon aktivitesi.....	91
Tablo 4.16: Enterokok suşlarının hemaglutinasyon aktivitesi oranları.	92
Tablo 4.17: Enterokok suşlarının bakteriyosin üretme yeteneği.	94
Tablo 4.18: <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> ve <i>E. gallinarum</i> suşlarına ait bakteriyosin üretme oranları.....	95
Tablo 4.19: Enterokok suşlarında virulans faktörlerinin fenotipik olarak genel değerlendirilmesi.	97
Tablo 4.20: Enterokok suşlarında virulans faktörlerinin fenotipik dağılım sıklığı.	100
Tablo 4.21: Enterokok suşlarında vankomisin direnç genlerinin (<i>vanA</i> ve <i>vanB</i>) PZR ile gösterilmesi.....	104

Tablo 4.22: Enterokok suşlarında streptomisin direnç geninin (<i>ant(6)-la</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	106
Tablo 4.23: Enterokok suşlarında gentamisin direnç geninin (<i>acc(6')-aph(2'')</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.	107
Tablo 4.24: Enterokok suşlarında kanamisin direnç geninin (<i>aphA-3</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	109
Tablo 4.25: Enterokok suşlarında rifampisin direnç genlerinin (<i>rpoB1</i> ve <i>rpoB2</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.	111
Tablo 4.26: Enterokok suşlarında ampisilin direnç geninin (<i>bla(Z)</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	112
Tablo 4.27: Enterokok suşlarında eritromisin direnç geninin (<i>ermB</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	114
Tablo 4.28: Enterokok suşlarında kloramfenikol direnç geninin (<i>catP1P</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	115
Tablo 4.29: Enterokok suşlarında tetrasiklin direnç genlerinin (<i>tetM</i> ve <i>tetL</i>) PZR yöntemi ile gösterilmesi.	117
Tablo 4.30: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerinin genotipik olarak genel değerlendirilmesi.	119
Tablo 4.31: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerinin dağılım sıklığı.	122
Tablo 4.32: Enterokok suşlarında <i>ace</i> geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.	124
Tablo 4.33: Enterokok suşlarında <i>gelE</i> geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	125
Tablo 4.34: Enterokok suşlarında <i>esp</i> geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	127
Tablo 4.35: Enterokok suşlarında <i>cylM</i> , <i>cylB</i> ve <i>cylA</i> genlerinin PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	129
Tablo 4.36: Enterokok suşlarında <i>efaAfs</i> ve <i>efaAfm</i> genlerinin PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	131
Tablo 4.37: Enterokok suşlarında <i>cpd</i> , <i>ccf</i> ve <i>cob</i> genlerinin PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	134
Tablo 4.38: Enterokok suşlarında <i>agg</i> geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.	135
Tablo 4.39: Enterokok suşlarında <i>fsr</i> geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.....	137
Tablo 4.40: Enterokok suşlarında virulans genlerinin genotipik olarak genel değerlendirmesi.	139
Tablo 4.41: Enterokok suşlarında virulans genlerinin bulunma sıklığı.....	142

Tablo 4.42: Enterokok suşlarının taşıdıkları çoklu virulans gen profilleri	144
Tablo 4.43: Enterokok suşlarında plazmit DNA sonuçları.....	147
Tablo 4.44: Enterokok suşlarında plazmit profil büyüklükleri.....	148



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrat derece
D	: Değişken
+	: Pozitif
-	: Negatif
%	: Yüzde
pH	: Hidrojen gücü
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
λ	: Lambda
<i>g</i>	: Gravity
bp	: Baz çifti
g	: Gram
h	: Hücre
kb	: Kilobaz
L	: Litre
M	: Molar
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
rpm	: round per minute (dakikadaki devir sayısı)
T_m °C	: Erime sıcaklığı
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
μm	: Mikrometre
μl	: Mikrolitre
V	: Volt

Kısaltmalar	Açıklama
<i>aac</i>	: Asetiltransferaz geni
ACT	: Asetiltransferaz
AAD6	: 6'-adeniltransferaz
Ace	: Adhesin to collagen from Enterococci (Enterokok adhezin bağlayan protein)
Acm	: <i>E. faecium</i> kollajen bağlayıcı adhezin
Agg	: Agregasyon faktörü
AK	: Amikasin
AME	: Aminoglikozit modifiye edici enzim
ANT	: Adeniltransferaz
APH	: Fosfotransferaz
ARA	: Arabinoz
ARG	: Arjinin
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BHI	: Beyin Kalp İnfüzyonu
Cyl	: Sitolizin
C	: Kloramfenikol
<i>cad</i>	: Seks feromonunu kodlayan gen bölgesi
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute (Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü)
CNA	: Columbia Kolistin-Nalidiksik Asit Agar
<i>ccf</i>	: Seks feromonunu kodlayan gen bölgesi
CN	: Gentamisin
<i>cob</i>	: Seks feromonunu kodlayan gen bölgesi
<i>cpd</i>	: Seks feromonunu kodlayan gen bölgesi
<i>cyl</i>	: Sitolizin geni
ÇAD	: Çoklu Antibiyotik Direnci
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dk	: Dakika
E	: Eritromisin
EcbA	: <i>E. faecium</i> kollajen bağlayıcı protein A
<i>efaA</i>	: <i>E. faecalis</i> Antijen A geni

EH	: Eskulin hidrolizi
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlı İmmunosorbent Deneyi)
Epa	: Enterokokkal polisakkarit antijeni
EPS	: Ekzopolisakkarit
ESC	: Eskulin
ESP	: Extracellular surface protein, Ekstrasellüler yüzey proteini
<i>fsr</i>	: Biyofilm oluşumundan sorumlu gen
Fss	: <i>E. faecalis</i> yüzey proteini
G	: Guanin
GAL	: D-Galaktoz
Gel	: Jelatinaz
GUR	: Glukuronidaz
GyrA	: DNA giraz alt ünitesi
Hyl	: Hyaluronidaz
HP	: Hippurik asit
K	: Kanamisin
Kob	: Koloni Oluşturan Birim
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LAP	: Lösin aminopeptit
LAPase	: Lösin aminopeptidaz
LTA	: Lipoteikoik asit
MAN	: D-Mannoz
MGP	: Metil- α -D-glikopiranozid
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MSCRAMM	: Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule, Yapışkan matriks molekülünü tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni
NA	: Nutrient Agar
NaCl	: Sodyum klorür
OD	: Optik yoğunluk
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
P	: Penisilin
PAL	: β -naphthyl phosphate
ParC	: Topoizomeraz IV alt ünitesi

PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
PBS	: Fizyolojik Fosfat Tamponu
PEA	: Feniletil Alkol Agar
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
PYR	: L-pyrolidonyl- β -naphthylamid
PYU	: Pirüvat
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAF	: Rafinoz
RD	: Rifampisin
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
S	: Streptomisin
SAL	: Secretory Antigen Like (Antijen Benzeri Salgı)
Scm	: <i>E. faecium</i> kollajen bağlayıcı adhezin
SB	: Standart bakteri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOR	: Sorboz
Srt	: Sortaz
TCC	: 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TE	: Tetrasiklin
TEL	: Tellürit
TIGR	: The Institute for Genomic Research (Genomik Araştırmalar Enstitüsü)
tet	: Tetrasiklin geni
TMP-SMX	: Trimetoprim-Sulfametoksazol
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
UV	: Ultra Viyole
VA	: Vankomisin
VP	: Voges-proskauer
VRE	: Vankomisine Dirençli Enterokok

ÖZET

DENİZ SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ENTEROKOK SUŞLARININ VİRULANS FAKTÖRLERİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

İpek ADA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Laktik Asit Bakterileri grubunda olan Enterokok cinsi bakteriler, insan ve hayvanların bağırsak florasının doğal mikroorganizması olup bağırsak dışı bölgelere yayılarak insanlarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olurlar. Çevresel kirliliğin fazla olduğu ve lağım ve kanalizasyon sularının karıştığı deniz sularında, fekal kirlilik indikatörü olarak bilinen Enterokoklar halk sağlığı açısından önemlidir. Kromozomal ya da plazmit ve konjugatif transpozonlarla intrinsik ve ekstrinsik antibiyotik direnç mekanizması ve virulans faktörlerine sahip olan Enterokoklar, patojen mikroorganizmalardandır. Çalışmamızda, turistik, balıkçılık, sulama ve kullanma suyunda önemi olan Marmara Denizi ve Karadeniz (Kilyos, Rumelikavağı, Yeşilyurt ve Üsküdar)'den alınan deniz suyu örnekleri ile ilgili daha önce yapılan bir çalışmadan izole edilen 66 Enterokok suşunun API[®]20 Strep test kiti ile tür doğrulaması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının antibiyotiklere dirençlilik profili [nalidiksik asit (NA), streptomisin (S), penisilin (P), kloramfenikol (C), vankomisin (VA), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP), kanamisin (K), amikasin (AM), eritromisin (E), gentamisin (CN), rifampisin (RIF)], hemoliz üretim aktivitesi, jelatinaz ve kazeinaz aktivitesi, biyofilm oluşturma kapasitesi, serum direnci aktivitesi, hemagglütinasyon ve bakteriyosin aktivitesi, fenotipik olarak incelenmiştir. Aynı zamanda suşların kromozomal ve plazmit

DNA izolasyonları yapılmış ve antibiyotik direnç genleri ile virulans faktörleri PZR yöntemi ile incelenmiştir. Hücre dışı matriks proteinlerine bağlanma (*ace*), jelatinaz aktivitesi (*gelE*), agregasyon faktörü (*agg*), konak dokulara tutunma ve biyofilm oluşumu (*esp*), jelatinaz ve serin proteaz ifadesini düzenleme (*fsr*), sitolizin üretimi (*cylM*, *cylB* ve *cylA*), Enterokok adezyon proteini varlığı (*efaAfs* ve *efaAfm*), seks feromonları (*cpd*, *cob* ve *ccf*) ve antibiyotik direnci [vankomisin (*vanA* ve *vanB*), streptomisin (*ant(6)-la*), gentamisin (*acc(6')-aph(2'')*), kanamisin (*aphA-3*), rifampisin (*rpoB1* ve *rpoB2*), ampisilin (*bla(Z)*), eritromisin (*ermB*), kloramfenikol (*catpIP*), tetrasiklin (*tetM* ve *tetL*) ile ilgili virulans faktörlerini kodlayan sorumlu olan genler, PZR yöntemi ile incelenmiştir. Diğer yandan, Enterokok suşlarının plazmit profilleri, moleküler büyüklükleri bilinen marker ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Çalışmada, API®20 Strep test kiti ile tür doğrulaması yapılan 66 Enterokok izolatının 13 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilik profili, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre incelenmiş ve *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının tür içi antibiyotik direnç oranları sırasıyla, penisilin için %60.8 ve %84.2, kloramfenikol için %10.86 ve %31.57, vankomisin için %41.3 ve %57.9, tetrasiklin için %52.7 ve %63.15, siprofloksasin için %17.4 ve %36.84, kanamisin için %97.82 ve %94.7, ampisilin için %39.13 ve %57.9, eritromisin için %50 ve %84.2, gentamisin için %100 ve %94.7 olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda tüm suşlar nalidiksik asit, amikasin ve rifampisine dirençli, streptomisine ise duyarlı olarak saptanmıştır. Çoklu antibiyotik direnç profilleri fenotipik olarak incelendiğinde, çoklu antibiyotik direncinin 5-11 arasında değiştiği, 3 (%6.52) *E. faecalis* ve 5 (%26.31) *E. faecium* suşunun en fazla 11 antibiyotiğe, 3 (%6.52) *E. faecalis* suşunu ise en az 5 antibiyotiğe çoklu direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Diğer yandan, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının fenotipik virulans faktörleri kıyaslandığında tür içi oranlarının sırasıyla, jelatinaz aktivitesi için %91.3 ve %94.7, kazeinaz aktivitesi için %67.4 ve %31.57, biyofilm oluşturma kapasitesinde kuvvetli tutunma için %41.3 ve %47.36, serum direnci aktivitesi için %52.7 ve %31.57, hemaglutinasyon aktivitesinde çok kuvvetli reaksiyon için %32.6 ve %0, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesi %32.6 ve %5.26, *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesi ise %23.4 ve %0 olarak belirlenmiştir. Çalışmada incelenen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının antibiyotik direnç genlerinin PZR yöntemi ile genotipik incelenmesi sonucu tür içi antibiyotik direnç gen oranları sırasıyla, *vanA* ve *vanB* genleri için %32.6 ve %31.57 ile %21.73 ve %31.57, *acc(6')-aph(2'')* geni için %100 ve %94.73, *aphA-3* geni için %97.82 ve %89.47, *rpoB2* geni için %97.82 ve %100, *bla(Z)* geni için %93.47 ve %89.47, *ermB* için %50 ve %84.2, *catpIP* için %71.73 ve %63.15, *tetM* ve *tetL* genleri için %56.52 ve %21.21 ile %43.47 ve %36.84 olarak tespit edilmiştir. Suşların tamamının ise *rpoB1* genine sahip iken, *ant(6)-la* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. Virulans genlerinin PZR yöntemi ile incelendiğinde ise tür içi virulans gen oranları sırasıyla, *ace* geni için %86.9 ve %0, *gelE* geni için %91.3 ve %89.4, *efaAfs* için %95.6 ve %0, *efaAfm* için %58.7 ve %63.1, *cpd* geni için %41.3 ve %26.3, *ccf* geni için %30.4 ve %63.1, *cob* geni için %56.5 ve %63.1, *agg* geni için %84.7 ve %57.9, *fsr* geni için %60.8 ve %63.1 olarak tespit edilmiştir. Suşların tamamının sitolizin üretiminden sorumlu genler olan *cylM*, *cylB* ve *cylA* genlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada incelenen 66 Enterokok izolatının çoklu antibiyotik direnç gen profili ve virulans gen profili incelendiğinde, 12 farklı antibiyotik direnç geninden bir (%2.17) *E. faecalis* ve bir (%100) *E. gallinarum* suşunun en az 4 direnç genine, bir (%2.17) *E. faecalis* suşunun ise en fazla 11 direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, 12 farklı virulans geninden 2 (%3.03) *E. faecalis* suşunun 12 gen bölgesi ile en fazla, 1 (%1.51) *E. gallinarum* suşunun ise 3 gen bölgesi ile en az virulans profili içerdiği saptanmıştır. Son olarak, çalışmada 66 adet Enterokok izolatının plazmit profilleri belirlenmiş ve 13 (%28.26) *E. faecalis* ve 3 (%15.78) *E. faecium* olmak üzere

toplam 16 (%24.24) suşun 340 ile 32600 bp arasında değişen 26 farklı moleküler büyüklükte plazmit içerdiği tespit edilmiştir.

Sonuçlar, deniz suyu örneklerinden izole edilen Enterokok suşlarının antibiyotik direnç ve virulans genlerine sahip olduğunu ve halk sağlığı açısından sorun oluşturabileceğini göstermektedir. Çalışmadan elde edilen verilerin, deniz suyundaki fekal kirlilik indikatörü olan Enterokok cinsi bakterilerin virulansı hakkında bilinçlenme ve tedavide olası yaklaşımları belirlemede katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Temmuz 2019, 219 sayfa.

Anahtar kelimeler: Enterokok, virulans, antibiyotik direnci, plazmit, deniz suyu.



SUMMARY

INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS OF ENTEROCOCCI STRAINS ISOLATED FROM SEWATER

Ph.D. THESIS

İpek ADA

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Enterococcus bacteria, which classified in the group of Lactic Acid Bacteria, are the natural inhabitants of the intestinal flora of humans and animals and causing various infections in humans by spread to extra-intestinal regions. Enterococci, which is known as fecal pollution indicator in marine waters where environmental pollution is high and where sewage and sewage waters are mixed, are important for public health. Enterococci, which have intrinsic and extrinsic antibiotic resistance mechanisms and virulence factors by chromosomal, plasmid or conjugative transposons, are pathogenic microorganisms. In our study, 66 *Enterococcus* strains isolated from a previous study on sea water samples taken from Marmara Sea and Black Sea (Kilyos, Rumelikavağı, Yeşilyurt and Üsküdar), which are important in tourism, fishing, irrigation and utility water, were confirmed with API[®]20 Strep test kit at species level. Antibiotic resistance profile [nalidixic acid (NA), streptomycin (S), penicillin (P), chloramphenicol (C), vancomycin (VA), tetracycline (TE), ciprofloxacin (CIP), canamycin (K), amikacin (AM), erythromycin (E), gentamicin (CN), rifampicin (RIF)], hemolysis production activity, gelatinase and caseinase activity, biofilm formation capacity, serum

resistance activity, hemagglutination and bacteriocin activity of the *Enterococcus* strains used in the study were examined phenotypically. Chromosomal and plasmid DNA isolations of the strains were made and antibiotic resistance genes and virulence factors were examined by PCR method. Binding to extracellular matrix proteins (*ace*), gelatinase activity (*gelE*), aggregation factor (*agg*), adherence to host tissues and biofilm formation (*esp*), regulation of gelatinase and serine protease expression (*fsr*), cytolysin production (*cylM*, *cylB* and *cylA*) The genes responsible for the presence of enterococcal adhesion protein (*efaAfs* and *efaAfm*), sex pheromones (*cpd*, *cob* and *ccf*) and virulence factors [vancomycin (*vanA* and *vanB*), streptomycin (*ant* (6)-*la*), gentamicin (*acc*(6')-*aph* (2'')), canamycin (*aphA-3*), rifampicin (*rpoB1* and *rpoB2*), ampicillin (*bla*(Z)), erythromycin (*ermB*), chloramphenicol (*catpIP*), tetracycline (*tetM* and *tetL*)] related to antibiotic resistance were examined by PCR method. On the other hand, plasmid profiles of *Enterococcus* strains were determined by comparing their molecular size with the known marker. In this study, the resistance profile of 66 Enterococci isolates against 13 different antibiotics were examined according to Kirby-Bauer disc diffusion method and the intraspecific antibiotic resistance rates of *E. faecalis* and *E. faecium* strains were 60.8% and 84.2% for penicillin, 10.86% and 31.57% for chloramphenicol, 41.3% and 57.9% for vancomycin, 52.7% and 63.15% for tetracycline, 17.4% and 36.84% for ciprofloxacin, 97.82% and 94.7% for kanamycin, 39.13% and %57.9 for ampicillin, 50% and 84.2% for erythromycin, 100% and 94.7% for gentamicin, respectively. All strains were also resistant to nalidixic acid, amikacin and rifampicin and susceptible to streptomycin. When multiple antibiotic resistance profiles were examined phenotypically, it was found that multiple antibiotic resistance ranged between 5-11, 3 (6.52%) *E. faecalis* and 5 (26.31%) *E. faecium* strains were up to 11 antibiotics and 3 (6.52%) *E. faecalis* strains multiple resistance to at least 5 antibiotics. On the other hand, when compared the phenotypic virulence factors of *E. faecalis* and *E. faecium* strains, 91.3% and 94.7% for gelatinase activity, 67.4% and 31.57% for caseinase activity, 41.3% and 47.36% for strong retention in biofilm formation capacity, 52.7% and 31.57% for serum resistance activity, 32.6% and 0% for very strong reaction in hemagglutination activity, bacteriocin activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was 32.6% and 5.26%, and bacteriocin activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 bacteria was 23.4% and 0% determined, respectively. Genotypic analysis of the antibiotic resistance genes of *E. faecalis* and *E. faecium* strains examined by PCR method in the study resulted in the in vitro antibiotic resistance gene ratios for 32.6% and 31.57% *vanA* and 21.73% and 31.57% for *vanB* genes, 100% and 94.73% for the *acc*(6')-*aph* (2'') gene, 97.82% and 89.47% for the *aphA-3* gene, 97.82% and 100% for the *rpoB2* gene, 93.47% and 89.47% for the *bla*(Z) gene, 50% and 84.2% for *ermB*, 71.73% and 63.15% for *catpIP*, 56.52% and 21.21% for *tetM* and 43.47% and 36.84% for *tetL* genes were identified. All strains had the *rpoB1* gene but not the *ant*(6)-*la* gene. When the virulence genes were examined by PCR method, the intra-species virulence gene rates were 86.9% and 0% for the *ace* gene, 91.3% and 89.4% for *gelE* gene, 95.6% and 0% for *efaAfs*, 58.7% and 63.1% for *efaAfm* and 41.3% and 26.3% for *cpd* gene, 30.4% and 63.1% for *ccf* gene, 56.5% and 63.1% for *cob* gene, 84.7% and 57.9% for *agg* gene, 60.8% and 63.1% for *fsr* gene, respectively. All strains were found to have the genes responsible for the production of cytolysin, *cylM*, *cylB*, and *cylA* genes. When the multiple antibiotic resistance gene profile and virulence gene profile of 66 Enterococci isolates examined in the study were analysed, one (2.17%) *E. faecalis* and one (100%) *E. gallinarum* strain had at least 4, and 1 (2.17%) *E. faecalis* strain had up to 11 of 12 different antibiotic resistance genes was determined. At the same time, 2 (3.03%) *E. faecalis* strains from 12 different virulence genes had the highest virulence profile with 12 gene regions and 1 (1.51%) *E. gallinarum* strain had the lowest virulence profile with 3 gene regions. Finally, in the study, plasmid profiles of 66

Enterococci isolates were determined and 16 (24.24%) strains, including 13 (28.26%) *E. faecalis* and 3 (15.78%) *E. faecium*, contained 26 different sized plasmids ranging from 340 to 32600 bp. The results show that *Enterococcus* strains isolated from seawater samples have antibiotic resistance and virulence genes and may cause problems for public health. It is thought that the data obtained from this study will contribute to the awareness of virulence of *Enterococcus* bacteria, which are indicators of faecal pollution in sea water and to determine possible approaches in treatment.

July 2019, 219 pages.

Keywords: *Enterococcus*, virulence, antibiotic resistance, plasmid, seawater.



1. GİRİŞ

Denizler, halk sağlığı açısından değerlendirilmesi gereken önemli su ortamlarındandır (Carlucci ve Pramer, 1960).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, sularda direkt ya da indirekt yolla meydana gelen fekal kirlilik sonucu patojenlerin halk sağlığı üzerine etkileri üzerinedir. Fekal kirliliğin, rekreasyonel su kullanıcılarının sağlığı üzerindeki etkisine ilişkin yapılan çalışmalarda, tatlı su ve deniz suyu örneklerinde, fekal Streptokoklar ve intestinal Enterokoklar da dahil olmak üzere pek çok fekal kirlilik indikatörü tanımlanmıştır (Prüss, 1998). Sularda fekal kirlilik indikatörü mikroorganizmalar total ve fekal koliform grubu bakteriler, fekal Streptokoklar ile sülfid indirgeyen *Clostridium perfringens* cinsi bakterilerdir (Olson ve diğ., 1991; Cartwright ve diğ., 1995; Jimmy ve diğ., 2013). İnsan ve sıcakkanlı hayvanların dışkıında mevcut olan fekal kontaminasyon indikatörlerinden olan fekal Streptokoklar dışkı ve lağım suları ile birlikte halk sağlığı problemlerine yol açmaktadır (Gilmore, 2002; Fisher ve Philips 2009; Yüksel, 2012). Kontamine deniz sularında yüzen ve kontamine suların kıyıya vurduğu plaj ve sahillerde bulunan insanlara deri yoluyla, doğal vücut boşluklarından giriş yoluyla ve su yutma sonucu oral yolla giriş yapan Enterokoklar aynı zamanda özellikle balık ve kabuklu deniz ürünlerinin tüketilmesiyle de geçiş yapabilmekte ve enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Doğal ve çevresel kaynaklardan izole edilen Enterokok cinsi bakteriler, aynı zamanda nozokomiyal enfeksiyonlara ürogenital sistem enfeksiyonları, gastrointestinal sistem enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi, septik şok ve menenjitte sebep olmaktadır (Yıldırım, 2007; Sood ve diğ., 2008; Yüksel, 2012; Kasaroğlu, 2013).

Gram pozitif kok, fakültatif anaerob olan Enterokoklar, %6.5 NaCl tuzluluk oranında, 10-45 °C arasındaki sıcaklıklarda ve pH 7.2-9.6 aralığında üreyebilmektedirler. Sıcaklık, tuzluluk, pH değişiklikleri gibi çevresel koşullara dayanıklı olan Enterokok cinsi bakteriler, aynı zamanda sahip oldukları virulans faktörleri ve başta 3. kuşak sefalosporinler, β -laktam antibiyotikler ve aminoglikozitlere doğal direnç göstermeleri ve transpozonlar ve plazmitler aracılığıyla vankomisin başta olmak üzere çoklu antibiyotik direnci özellikleri ile hastalık yapma potansiyellerini arttırmaktadırlar (Shepard ve Gilmore 2002, Wax ve diğ., 2008; Arias

ve Murray 2012; Yüksel, 2012). Bu çalışmada, turistik, balık üretim, sulama ve kullanma suyu olarak önem arz eden bölgelerden olan Marmara Denizi ve Karadeniz (Kilyos, Rumelikavağı, Yeşilyurt ve Üsküdar)'den daha önce yapılan bir çalışmadan izole edilen (Kimiran Erdem ve diğ., 2007) ve API[®]20 Strep test kiti ile doğrulanmış 66 Enterokok suşunun virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, hemoliz üretim aktivitesi, jelatinaz aktivitesi, kazeinaz aktivitesi, biyofilm oluşturma kapasitesi, serum direnci aktivitesi, hemagglütinasyon ve bakteriyosin aktivitesi, antibiyotiklere dirençlilik profili [nalidiksik asit (NA), streptomisin (S), penisilin (P), kloramfenikol (C), vankomisin (VA), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP), kanamisin (K), amikasin (AM), eritromisin (E), gentamisin (CN), rifampisin (RIF)] fenotipik olarak incelenmiştir. Ayrıca, 66 Enterokok suşunun, hücre dışı matriks proteinlerine bağlanması (*ace*), jelatinaz aktivitesi (*gelE*), agregasyon faktörü (*agg*), konak dokulara tutunma ve biyofilm oluşumu (*esp*), jelatinaz ve serin proteaz ifadesini düzenleme (*fsr*), sitolizin üretimi (*cylM*, *cylB* ve *cylA*), Enterokok adezyon proteini varlığı (*efaAfs* ve *efaAfm*), seks feromonları salınımı (*cpd*, *cob* ve *ccf*) ve antibiyotik direnci [vankomisin (*vanA* ve *vanB*), streptomisin (*ant(6)-la*), gentamisin (*acc(6')-aph(2'')*), kanamisin (*aphA-3*), rifampisin (*rpoB1* ve *rpoB2*), ampisilin (*bla(Z)*), eritromisin (*ermB*), kloramfenikol (*catpIP*), tetrasiklin (*tetM* ve *tetL*) ile ilgili virulans faktörlerini kodlayan genler, PZR yöntemi ile incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin, Enterokok cinsi bakterilerin herhangi bir salgına neden olmadığı düşünülen çevresel izolatlarının enfeksiyon oluşturma potansiyellerinin belirlenmesine ve epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENTEROKOK CİNSİ BAKTERİLER

2.1.1. Enterokokların Sınıflandırılması ve Tarihçesi

Enterokok, ilk kez 1899 yılında Thiercelin tarafından Fransa’da yayınlanan bir çalışmada ‘enterocoque’ olarak adlandırılmış ve insan dışkılarından izole edilen, ışık mikroskopunda kısa zincirler halinde görülen bakteri olarak tanımlanmıştır (Stiles ve Holzapfel, 1997). 1906 yılında Andrews ve Holder, ilk kez nozokomiyal enfeksiyon kaynağı olarak endokarditli bir hastanın kanından izole edilen, mannitolü ve laktozu fermente eden fakat rafinozu fermente etmeyen bu bakteriye *Streptococcus faecalis* adını vermiştir. 1919 yılında ise Orla ve Jensen ise karbonhidratları fermente etme özelliği bakımından *S. faecalis* türünden farklılık gösteren türe *Streptococcus faecium* adını vermişlerdir. Zamanla karbonhidratları fermente etme özelliklerine göre *Streptococcus* cinsine yeni türler eklenmiştir. *Streptococcus* cinsi Sherman tarafından 1937 yılında yapısal özelliklerine göre; fekal streptokoklar (Enterokoklar), süttten izole edilen Streptokoklar, viridans Streptokoklar ve piyojen Streptokoklar olmak üzere 4 alt grupta sınıflandırılmıştır (Klein, 2003). Uzun bir süre *Streptococcus* cinsi içerisinde yer alan *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* türlerinin diğer katalaz negatif, fakültatif anaerob, Gram pozitif kok bakterilerden; %40 safraya dirençli olması, eskulin hidrolizi, %6.5 NaCl içeren ortamda üreyebilmesi ve PYR hidrolizini gerçekleştirebilmesi gibi farklı özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 2.1).

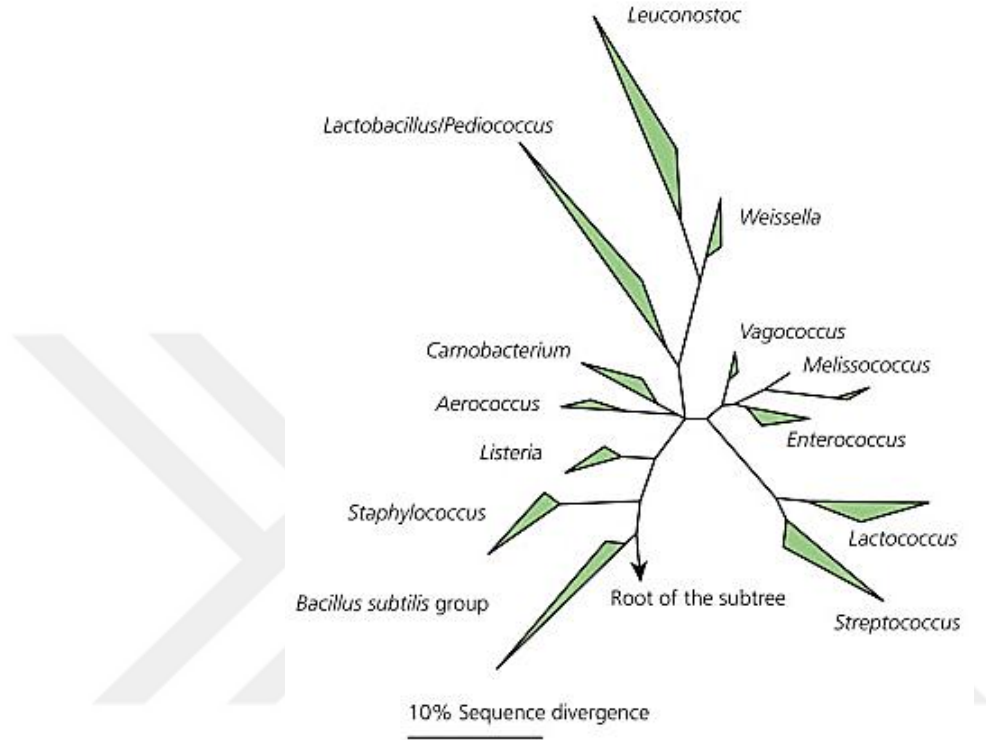
Tablo 2.1: Enterokokları diğer Gram pozitif koklardan ayıran özellikler (Facklam ve Sahm, 1995; Facklam ve Teixeira, 1998).

Cins	Morfoloji	Hareket	VAN	PYR	EH	NaCl	10 °C’de üreme	45 °C’de üreme
<i>Enterococcus</i>	Zincir	D	Du	+	+	+	+	D
<i>Streptococcus</i>	Zincir	-	Du	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus</i>	Zincir	-	Du	-	+	D	+	-
<i>Leuconostoc</i>	Zincir	-	Du	-	D	D	+	-
<i>Pediococcus</i>	Küme	-	Du	-	+	D	-	-

D:Değişken, **Du:** Duyarlı, **VAN:** Vankomisin (30 µg disk) duyarlılığı, **PYR:** L-pyrolidonyl-β-naphthylamid hidrolizi, **EH:** Eskulin hidrolizi, **NaCl:** %6.5 NaCl içeren besiyerinde üreme, +: Pozitif, -: Negatif.

1984 yılında Schleifer ve Kilpper-Balz tarafından gerçekleştirilen DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA dizi analizi sonuçlarına göre *Enterococcus* cinsi bakterilerin filogenetik olarak

farklı bir cins içerisinde yer alması gerektiği belirtilmiştir (Şekil 2.1). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, *Enterococcus* cinsi içerisinde en az 34 tür olduğu belirtilmiştir (Billström ve diğ., 2008).



Şekil 2.1: Enterokok cinsinin 16S rRNA dizi analizi özelliklerine göre hazırlanan filogenetik dendrogram (Klein, 2003).

Enterokok cinsi bakteriler, biyokimyasal özelliklerine göre beş gruptan oluşmaktadır (Facklam ve Teixeira, 1998).

Grup I (*Enterococcus avium*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus gilvus*): Mannitol, sorbitol ve sorboz gibi karbonhidratları içeren sıvı besiyerinde asit oluşturarak, besiyerinde pH değişikliği ile beraber renk değişimine sebep olur. Arjinini hidrolize edecek enzime sahip değildirler.

Grup II (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus mundtii* ve *Enterococcus gallinarum*): Mannitol içeren sıvı besiyerinde asit oluştururken, sorbozdan asit oluşturmazlar. Arjinini hidrolize edemezler ve sorbitol reaksiyonları değişiklik gösterir.

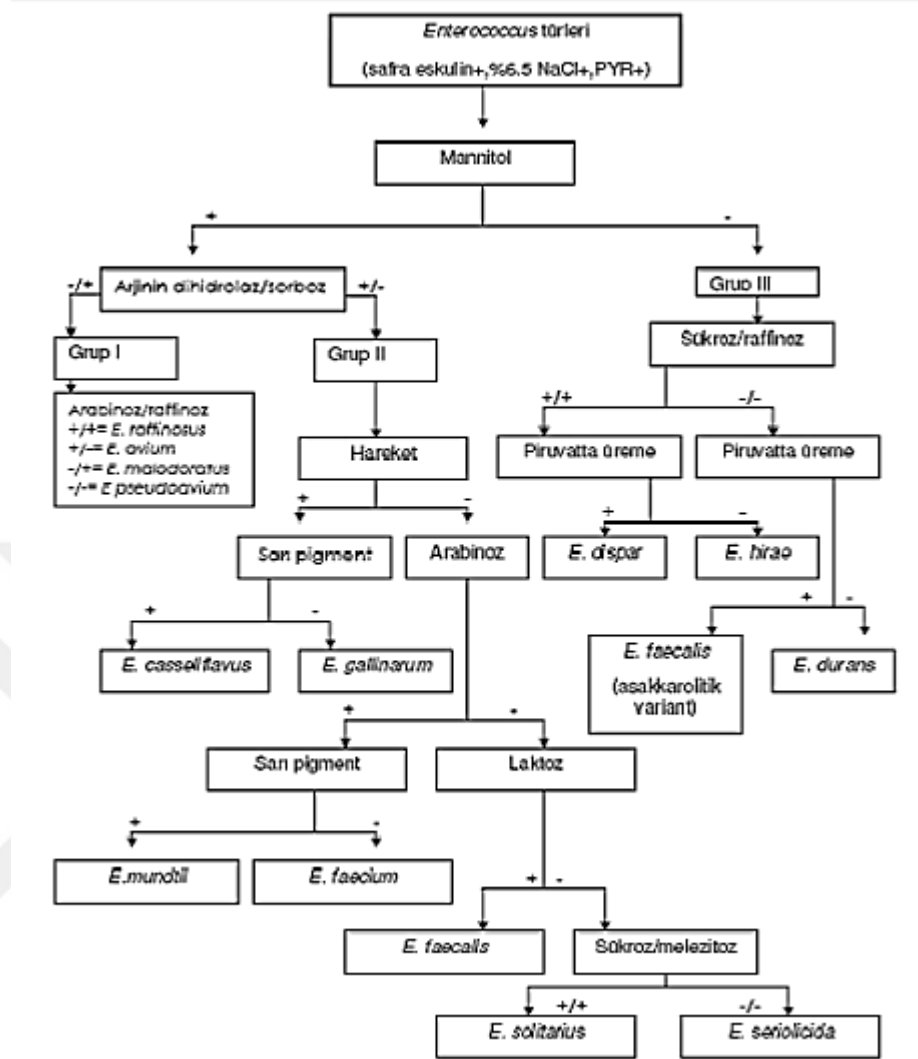
Grup III (*Enterococcus villorum*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus ratti* ve *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin mannitol içeren sıvı besiyerinde asit oluşturmayan alt grupları): Mannitol, sorboz ve sorbitol karbonhidratlarını içeren sıvı besiyerinde asit oluşturmaz, dolayısı ile besiyerinde pH değişikliği ve renk değişimi gözlemlenmez. Arjinini hidrolize ederler.

Grup IV (*Enterococcus sulfurens*, *Enterococcus asini*, *Enterococcus phoeniculcola* ve *Enterococcus cecorum*): Mannitol ve sorboz karbonhidratlarını içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arjinini hidrolize etmezler.

Grup V (*Enterococcus columbae*, *Enterococcus canis*, *Enterococcus moraviensis*): Arjinini hidrolize edemezler ve sorbitol reaksiyonları değişkenlik gösterir. Mannitol içeren sıvı besiyerinde asit oluştururken sorbozdan asit oluşumu gerçekleştirmezler.

Enterokoklar, karbonhidrat içeren sıvı besiyerlerinde fermentasyon özelliklerine, arjinin ve %0.04 tellürit hidrolizine, pirüvat kullanımlarına, metil- α -D-glikopiranozid (MGP)'yi fermente etmelerine ve hareket özelliklerine göre türlere ayrılırlar (Tablo 2.2)

Biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılan Enterokoklar Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Enterokok türlerinin biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanma şeması (Akçimen, 2010).

Tablo 2.2: Enterokokların biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması (Lehman, 2011).

Enterokok	Hareket	MAN	SOR	ARA	RAF	TEL	ARG	PYU	MGP
<i>E. faecalis</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	-
<i>E. faecium</i>	-	+	-	+	D	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. avium</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	+	+	-	+	+	-	-	D	+
<i>E. gallinarum</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>E. raffinosus</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+

MAN: Mannitol, SOR: Sorboz, ARA: Arabinoz, RAF: Rafinoz, TEL: Tellürit, ARG: Arjinin, PYU: Pirüvat, MGP: Metil- α -D-glikopiranozid, +: Pozitif, -: Negatif, D: Değişken.

2.1.2. Enterokok Cinsi Bakterilerin Fenotipik Özellikleri

Enterokoklar, 0.6-2.5 μm boyutunda, Gram pozitif kok ya da nadiren kokobasil şeklinde, tekli, ikili ya da kısa zincirler oluşturabilen, sporsuz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif,

fakültatif anaerob bakterilerdir (Teixeira ve diğ., 2011). Asit, alkali, sıcaklık, hiperosmolarite, safra tuzu ve kimyasal ajanlara kısa sürede adapte olarak uygunsuz ortam koşullarına direnç gösterirler. Optimum 35 °C’de üremesine rağmen 10-45 °C arasında değişen geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmektedirler. Enterokok cinsi bakterilerin 60 °C’de 30 dakika ısıtma işlemine maruz kaldıklarında, pH 9.6’da ve %6.5 NaCl varlığında, canlılıklarını sürdürebildiği belirlenmiştir (Gilmore, 2002; Foulquié Moreno ve diğ., 2006; Fisher ve Philips, 2009). Karbonhidratlardan fermentasyon yoluyla laktik asit oluştururlar, gaz oluşturmazlar. Genellikle hareketsiz olup, bazı Enterokok türleri (*E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*) hareketlidir. Pek çok Enterokok türü (*E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* dışında), sahip oldukları pirolidonil arilamidaz (pirolidonaz PYRaz) enzimi sayesinde *L-pyrolidonyl-β-naphthylamid* (PYR) maddesini hidrolize ederler. %40 safra tuzu varlığında eskulini hidrolize edip 1,3,5-trimetil-tetrazolyum klorürü (TCC) indirgeyerek eskulin içeren besiyerlerinde siyah halo ile çevrelenmiş koloni oluştururlar. Tüm Enterokok suşlarında bulunan leucine aminopeptidase (LAPase) enzimi ile leucine β-naphthylamide yapısını hidroliz ederler (Teixeira ve diğ., 2011).

Karışık kültür içeren örneklerden Enterokok cinsi bakterileri ayırt etmek için, Safra-Eskulinazid Agar, Enterococcosel Agar, Columbia Kolistin-Nalidiksik Asit Agar (CNA), Feniletıl Alkol Agar (PEA) gibi selektif besiyerleri kullanılmaktadır (Winn ve diğ., 2006). Enterokok cinsi bakteriler, Kanlı Agar besiyerinde hemoliz aktivitesi (α , β ve γ hemoliz) gösterebilmektedir (Arıkan Akan, 2009).

2.1.3. Enterokokların Epidemiyolojisi

Laktik Asit Bakterileri (LAB) grubuna dahil olduğu bilinen ve *Enterococcaceae* ailesi içinde bulunan *Enterococcus* cinsi bakteriler, genellikle fekal kirlilik gösteren tatlı/tuzlu sular ve yüzey suları, toprak ve gıdada, insan ve hayvanların gastrointestinal sisteminde (GİS) yaygın olarak, perineal deri, oral kavite, dental plak, vajinal sekresyonlar, üretra ve safra yollarında daha az sıklıkta bulunmaktadır. Özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri fekal kirlilik göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Fisher ve Phillips., 2009; Hijazi ve diğ., 2009). Bunların dışında; çiftlik hayvanları ve kanatlı hayvanlar, tavuk, sığır ve domuz gibi hayvanların dışkılarından *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin yanında nadiren *E. cecorum*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. avium*, bitkisel kaynaklı ürünlerden ise genellikle

E. mundtii ve *E. casseliflavus* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Tunail, 1999; Franz ve diğ., 2003).

2.2. ENTEROKOK CİNSİ BAKTERİLERİN PATOGENEZİ

2.2.1. Enterokok Cinsi Bakterilerin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

İnsanlarda normal bağırsak florası olan ve dışkıda 10^5 - 10^7 kob/g'dan daha fazla bulunan Enterokoklar, sahip oldukları virulans faktörleri ve antibiyotik direnç mekanizmaları ile uygun şartlarda bağırsak dışındaki dokulara yayılım göstererek enfeksiyona sebep olurlar. Çevresel kaynaklarda bulunabilen uygun şartlarda bağırsak epitelyum hücreleri üzerinden lenf nodları ve diğer hücrelere yayılım gösterebilen ve bu sebeple hücre içi kaynaklı olduğu düşünülen Enterokoklar, özellikle son zamanlarda vankomisine ve aminoglikozidlere gösterdiği antibiyotik direnç mekanizmaları sayesinde nozokomiyal enfeksiyonlarla da karşımıza çıkmaktadır.

Enterokokların sebep olduğu enfeksiyonlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Üriner Sistem Enfeksiyonları: Enterokokların en sık sebep olduğu nozokomiyal enfeksiyonlardan olup üriner kateterizasyon işlemi sonrasında ortaya çıkabilmekte olup sistit, pyelonefrit, prostatite sebep olabilmektedir.
2. Bakteriyemi ve endokardit: Çevresel kaynaklı epidemiyolojik salgınların yanında nozokomiyal bakteriyemi olarak da oluşum gösterebilmektedir. Kalp kapakçıkları, protezler, intravenöz ve intraarteriyel kataterlere de yerleşebilen Enterokok cinsi bakteriler arasında özellikle *E. faecalis*'in endokardite sebep olduğu ve yaşlı ve immunsupresif bireylerde mortalite oranının yüksek olduğu bildirilmektedir.
3. İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar: Enterokoklar, akut ya da kronik böbrek yetmezliği olan, nefrotik sendromlu hastalar ile periton diyalizli hastalarda peritonite sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, sezeryandan sonra intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlara da sebep olabildiği bildirilmiştir.
4. Yara ve doku enfeksiyonları: Enterokokların, nadir de olsa yanık sonrası yaralardan, cerrahi yara enfeksiyonlarından, dekübit ülserlerinden izole edilebildiği ve selülite sebep olduğu belirlenmiştir.

5. Menenjit: Enterokokların, kana karışıklarında nadiren de olsa menenjite sebep olabildiği belirlenmiştir.
6. Solunum yolu enfeksiyonları: Enterokoklar, özellikle pnömoni, akciğer apsesi hastalığı olan bireylerde nadir de olsa izole edilmekte ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir.
7. Yenidoğan sepsisi: İmmüsupresif, prematüre bebeklerde intravenöz ya da intraarteriyel katater uygulaması sonucu, yüksek ateş ile birlikte seyreden ve tüm vücuda yayılan yenidoğan sepsisine sebep olabilmektedir (Yamazhan ve Ulusoy, 2013; Ödemiş ve diğ., 2018).

2.2.2. Enterokok Genomu ve Genetik Bilgi Transferi

Enterokok DNA'sı G+C içeriği %37-45 arasındadır. The Institute for Genomic Research (TIGR) ve Joint Genomic Institute of the Department of Energy Birimi'nde yapılan çalışmada, nozokomiyal enfeksiyonlardan sıklıkla izolasyonu yapılan *E. faecalis*, *E. faecalis* V583, *E. faecium* ve *E. faecium* ATCC BAA-472 suşlarına ait genomik DNA dizisi çıkartılmıştır. Çalışma sonucunda, *E. faecalis* V583 suşuna ait genomun 3.218.031 baz çifti uzunluğunda olup 3182 'open reading frame' (ORF) alanı içerdiği ve bu ORF sayesinde Enterokok türleri ile Stafilokok ve Streptokok cinsi bakterilerin genomu arasında lateral gen transferi meydana geldiği bildirilmiştir. *E. faecium* genomu G+C içeriği %37.8 olmakla birlikte, genom 2.928.706 baz çifti büyüklüğünde olup 3309 ORF içermektedir. Konjugatif özellikte ve transpozonlara, patojenite adalarına (PAI), integre plazmit genlerine, faj bölgelerine, insersiyon dizileri ve ekzojen gen bölgelerine sahip olan *E. faecalis* V583 suşunun, ekstrasik (kazanılmış) DNA dizilerine sahip olduğu ve VanB genotipi ile vankomisine direnç gösteren ilk suş olduğu belirlenmiştir. Konjugatif plazmitler ve transpozonlar sayesinde virulans genleri ve antimikrobiyal direnç genlerinin aktarımı gerçekleşmektedir. Ayrıca *E. faecalis* V583 suşunun ekstrakromozomal DNA bölgesinde, G+C içeriği %34 ve büyüklükleri 66320, 57660 ve 17963 baz çifti büyüklüğünde 3 plazmit bulunmaktadır. Virulans genlerinin veya antimikrobiyal direnç genlerinin transferinde rol oynayan plazmitler önem göstermekte olup, Enterokok suşlarında bu görevi üstlenen Rolling circle replicating plazmit (RCR), Inc18 plazmit ve feromon üretiminden sorumlu plazmit olmak üzere 3 ayrı plazmit bulunmaktadır. Bunlardan RCR ve Inc18 plazmitleri diğer bakterilerde de replike olabilirken, feromon salgılayan plazmitler başta *E. faecalis* olmak üzere sadece Enterokoklarda replike olabilmektedir. Her Enterokok suşunda plazmit

bulunmak zorunda olmayıp direnç ve virulans genleri korozomal DNA üzerinde de bulunabilmektedir. Plazmiti olmayan suşlarda genetik bilgi transferi, alıcı suşlarda ekstrasellüler feromonun salgılanması ve verici suşun ekstrasellüler yapısında agregasyon faktörü (AF) adı verilen protein yapısındaki maddenin oluşumu ile AF'nin alıcı hücrenin yüzeyine bağlanarak alıcı ile verici hücre arasında gen aktarımının gerçekleşmesi ile meydana gelmektedir. Bu seks feromonları sayesinde plazmit geçişi daha fazla olmaktadır.

Enterokoklar, özellikle antibiyotik direnç genlerini konjugatif transpozonlar ile genetik bilgi değişimi ile gerçekleştirmektedir. Bu sayede, özellikle tetrasiklin, eritromisin, gentamisin, kanamisin ve aminoglikozidlere direnç genleri taşıdığı belirlenmiştir. Konjugatif transpozonlar sadece Enterokoklara özgü olmayıp diğer bakterilerde de bulunabilmektedir. Enterokok cinsi bakterilere özgü olan konjugatif transpozonlar ise; Tn916 (*E. faecalis*'te tetrasiklin direnci), Tn1546 (vankomisin direncini kodlayan *vanA* gen bölgesi), Tn1547, Tn1549 ve Tn5382 (vankomisin direncini kodlayan *vanB* gen bölgesi), Tn5281 (gentamisin direncinden sorumlu *aac(6')-le-aph(2'')-la* geni) olup konak patojenisinden sorumludur (Gilmore, 2002; Giraffa, 2002; Klare, 2003).

Son yıllarda çevresel ve klinik örneklerden izole edilen Enterokoklarda belirlenen antimikrobiyal direnç geni ve virulans genleri nedeni ile enfeksiyonla mücadelede zorluklar yaşandığı belirlenmiştir.

2.3. ENTEROKOK CİNSİ BAKTERİLERİN VİRULANS FAKTÖRLERİ

Çoklu antibiyotik direnci gösterebilen ve bu sayede bağırsak dışına yayılım gösterebilen fırsatçı patojen Enterokoklar süperenfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Plazmit ile gen transferi dışında Enterokok kromozomal DNA'sında pek çok virulans faktörü bulunmaktadır. Bunlar;

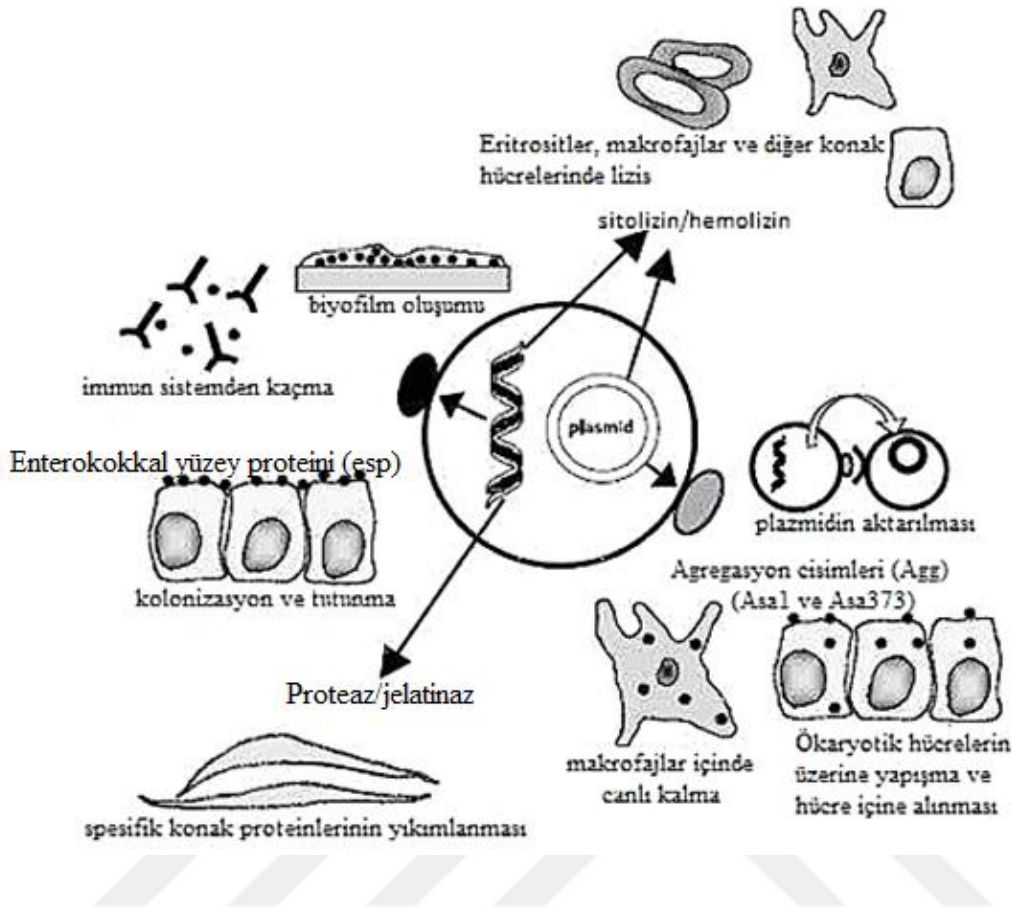
- 1- Konak Dokulara Tutunma: [Agregasyon faktörü (*agg*), Enterokok ekstrasellüler yüzey proteini (*esp*), kollajen bağlayıcı adhezin (*ace*), *Enterococcus faecalis* yüzey antijen A proteini (*efaAfs*, *efaAfM*)],
- 2- Biyofilm Oluşumu: (*bopD*, *fsr*, *ebp*, *srtC*, *sal*, *epa*, *dltA*),
- 3- Konak Savunma Mekanizmalarını Önleme: (Lipoteikoik asit, ekstrasellüler süperoksit üretimi, Enterokok bakteriyosinleri),

- 4- Konak İmmun Kaçışta Rol Oynayan Bakteri Hücre Komponenti (Kapsül polisakkarit antijenleri),
- 5- Sahip Olduğu Enzimler: [Hemolizin/sitolizin (*cylA*, *cylB*, *cylM*), jelatinaz (*gelE*), hyaluronidaz (*hyl*)]
- 6- Seks Feromonları (*cob*, *cad*, *cpd* ve *ccf*).

Enterococcus cinsinde tanımlanan virulans faktörleri ve virulanstan sorumlu genler Tablo 2.3'te belirtilmiş ve Şekil 2.3'te gösterilmiştir (Kariyama ve diğ., 2000; Mundy ve diğ., 2000; Eaton ve Gasson, 2001; Shankar ve diğ., 2002; Toledo-Aran ve diğ., 2001).

Tablo 2.3: *Enterococcus* cinsinde tanımlanan virulans faktörleri ve virulanstan sorumlu genler (Kariyama ve diğ., 2000; Mundy ve diğ., 2000; Eaton ve Gasson, 2001; Shankar ve diğ., 2002; Toledo-Aran ve diğ., 2001)..

Gen	Virulans Faktörleri
<i>efaA_{fm}</i> , <i>efaA_{fs}</i>	<i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> suşlarının hücre duvarı ile ilişkili adhezinler
<i>agg</i>	Ökaryotik hücrelere tutunmada ve konjugasyonda rol oynayan agregasyon proteini
<i>gelE</i>	Jelatin, kollajen, fibrinojen, kasein, hemoglobini lizis eder.
<i>cylL_L</i> , <i>cylL_S</i>	Sitolizin ve bakteriyosin öncüleri olan, ökaryotik hücreleri ve diğer Gram pozitif bakterileri lizis eder.
<i>cylM</i>	Sitolizinin posttranslasyonel modifikasyonu
<i>cylB</i>	Sitolizin transportu
<i>cylA</i>	Sitolizin aktivasyonu
<i>esp</i>	Konak immün yanıtından kaçmada rol oynayan ve <i>cyl</i> genleri ile bağlantılı olabilen hücre duvarı ilişkili protein
<i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> , <i>cad</i>	İnsan lökositleri için kemotaktik ajanlar olup, konjugasyonda ve gen aktarımında rol oynarlar.
Lipoteikoik asit (LTA)	İnsan monositleri yoluyla sitokin üretiminin indüklenmesi
Süperoksit	Konak bağırsak epitel hücrelerinde hücre ve DNA hasarına sebep olur.
Hyaluronidaz	Konak kollajen bağ dokusunu parçalamada görev alan ve hücre yüzeyi ile ilişkili olan protein.



Şekil 2.3: Enterokok cinsi bakterilerde virulans faktörleri (Çetinel Aksoy, 2008).

2.3.1. Konak Dokulara Tutunma

Enterokok patogenezi ve virulansında konak dokulara tutunma ve biyofilm oluşumu ilk sıralarda gelmektedir. İnsan bağırsak sisteminin normal florasında bulunan *Enterococcus* cinsi bakteriler, bağırsak peristaltik hareketleri ile birlikte sindirim sistemi dışına çıkarak lökosit, epitel hücrelere ve ekstrasellüler matrikse geçebilmektedir. Kromozomal virulans faktörü ve direnç mekanizmalarına sahip ya da plazmitler ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile aktarılmış virulans genlerine sahip *Enterococcus* cinsi bakteriler konak dokulara tutunarak enfeksiyona sebep olmaktadır. Konak hücrelere tutunma ve biyofilm oluşumu ile patogeneizde rol oynayan Enterokok adhezinleri, fagositoz görevi görmekte ve konak immun yanıtını inhibe etmektedir (Yüksel, 2012).

2.3.1.1. Agregasyon Faktörü

Enterokoklarda, konak hücre yüzeyine bağlanmayı sağlayan bir protein olan agregasyon faktörü, aynı zamanda bakteriler arasında plazmit aktarımını sağlayan adhezin yapılı bir moleküldür. Hücre duvarında yer alan, plazmit transferini kolaylaştıran, kompleman reseptörü

yoluyla opsonizasyondan bağımsız şekilde nötrofillere bağlanma özelliği gösteren agregasyon faktörü, 'agg' geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, agregasyon faktörü ve sitolizinin birarada sinerjistik etki göstererek biyofilm oluşumunun ana basamağı olan quorum sensing mekanizmasını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir (Chow ve diğ., 1993).

Enterokok agregasyon faktörü, özellikle intestinal epitel hücreleri ve renal dokular başta olmak üzere, kalp kapakçıkları, nötrofiller, genital organlar, dermis tabakası ve oral boşluklara yerleşerek kolonize olmaktadır. Makrofaj ve fagositlere karşı direnç gelişmesinde etkili olduğu bilinen *agg* geni, konak dokuda endokardite, gastrointestinal ve üriner sistem enfeksiyonlarına ve bakteriyemiye sebep olmaktadır (Özseven ve diğ., 2011).

Agregasyon faktörü, Enterokok türleri arasında diğer virulans ve antibiyotik direnç genlerinin aktarımını da sağlamaktadır. Yapılan çalışmada, agregasyon faktörü üreten Enterokok suşlarının pek çoğunun sitolizin de ürettiği, böylelikle daha virulan olabildiği belirlenmiştir (Gültekin, 2004; Devriese ve diğ., 2006; Upadhyaya, 2009).

2.3.1.2. Enterokok Ekstrasellüler Yüzey Proteini

Konak dokulara tutunma, kolonizasyon ve konak immün yanıttan kaçışta rol oynayan ekstrasellüler hücre proteinleri, *esp* geni tarafından kodlanmaktadır. İlk kez 1999 yılında Enterokoklarda hücre duvarı ile ilişkili olduğu belirlenmiş bu genin 153 kb büyüklüğündeki patojenite adasında bulunduğu belirlenmiştir (Shankar ve diğ., 1999). Adhezyon mekanizmasına sahip olduğu düşünülen *esp* geni, genellikle epidemiyolojik ya da nozokomiyal enfeksiyonlardan elde edilen Enterokok türlerinde bulunmakta olup 5622 bp büyüklüğündedir (Foulquie Moreno ve diğ., 2006).

Genellikle bakteriyemili ve endokarditli hastalardan alınan örneklerden izole edilen Enterokok suşlarında bulunan *esp* geninde kodlanan bu proteinin, konak dokulara tutunmada ve konak immün yanıtından kaçışta rol oynadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda *esp* geni, konjugasyonla diğer Enterokok suşları arasında da yayılabilmektedir. Özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde virulans faktörü olarak bulunduğu ve epidemik suşların belirlenmesinde marker olarak kullanılabilceği belirlenmiştir (Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Oancea, 2004; Tendolkar ve diğ., 2003; Coque ve diğ., 2005; Upadhyaya ve diğ., 2009).

Uygunsuz şartlarda Enterokoklarda direnç gelişmesini sağlayan *esp* geni, özellikle abiyotik yüzeylere tutunma ve biyofilm tabakası oluşumundan da sorumludur. Abiyotik yüzeylere ilk

tutunma, *esp* geninin yanında *gelE* geninin de rol oynadığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *esp* geni taşımayan Enterokok suşlarının biyofilm oluşturmada yetersiz oldukları, sonrasında plazmit ile *esp* geni transferi yapılan aynı suşlarda biyofilm oluşturabilme yeteneği kazandıkları belirlenmiştir. Enterokoklar, bu biyotik ve abiyotik biyofilm oluşturabilme yetenekleri sayesinde, konak dokuda özellikle endokardit, endodontik enfeksiyonlar ve üriner sistem enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Fisher ve diğ., 2009).

2.3.1.3. Kollajen Bağlayıcı Adhezin

Enterokok kollajen bağlayıcı adhezin yapıları proteinler, özellikle kommensal ve patojenik *E. faecalis* türünde yer alan, konak dokudaki kollajene bağlanarak enfeksiyonlara ve konak doku hasarına sebep olan bir virulans faktörüdür. *E. faecalis* V583 suşunda 17, *E. faecium* TX0016 suşunda 15 kollajen bağlayan adhezin belirlenmiş olmakla beraber, günümüzde 7 tane daha Enterokokkal kollajen bağlayıcı adhezin bulunmuştur.

Ace (*E. faecalis* kollajen bağlayan adhezin): Enterokokkal enfeksiyonlarda önemli bir rolü olan ve *E. faecalis*'te tip I ve tip IV kollajen bağlayıcı enzim olarak geçen Ace, *S. aureus*'un kollajen bağlayan Cna proteiniyle benzerlik göstermektedir (Upadhyaya ve diğ., 2009).

Fss1, Fss2 ve Fss3 (*E. faecalis* yüzey proteinleri),

Acm (*E. faecium* kollajen bağlayıcı adhezin): Acm, *E. faecium*'da tespit edilmiş olup tip I başta olmak üzere tip IV kollajenlere de bağlanabilmektedir (Nallapareddy ve diğ., 2003).

Scm (*E. faecium* kollajen bağlayıcı adhezin): *E. faecium*'da tespit edilmiş olup tip V kollajen ve fibrinojenlere bağlanabilmektedir (Nallapareddy ve diğ., 2006; Sillanpaa ve diğ., 2008).

EcbA (*E. faecium* kollajen bağlayıcı protein A)'dır (Rich ve diğ., 1999; Sava ve diğ., 2010).

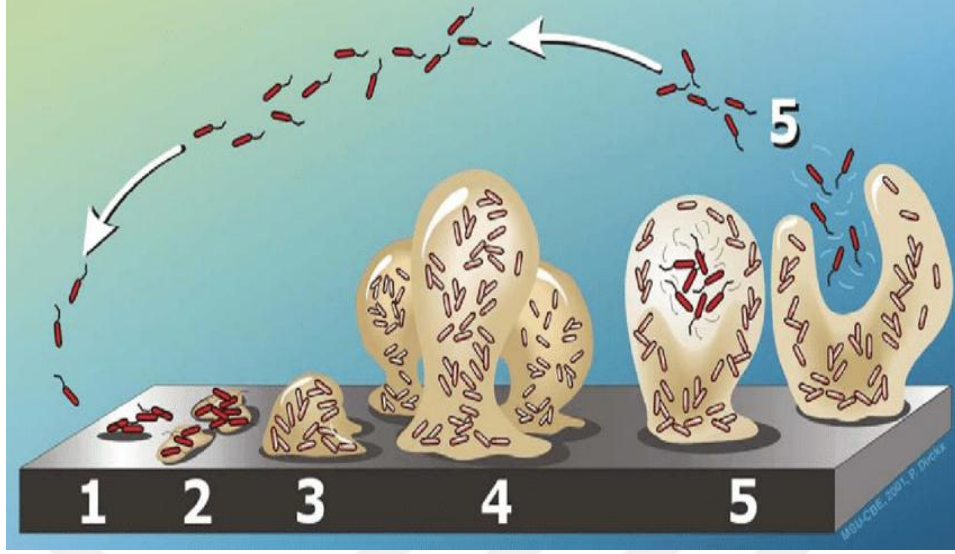
Yapılan *in vitro* deneylerde, enfekte kişide Ace'lere karşı antikor oluştuğu, fakat antikorun Ace'nin hücre dışı matriks proteinlerine tutunmasını engellediği belirlenmiştir (Nallapareddy ve diğ., 2003; Tendolkar ve diğ., 2003; Sava ve diğ., 2010).

2.3.1.4. *Enterococcus faecalis* Antijen A Proteini (EfaA Proteini)

EfaA geninde kodlanan *Enterococcus faecalis* Antijen A protein olarak bilinen EfaA proteini, ilk kez endokarditli bir hastadan alınan örnekten izole edilen *E. faecalis* suşunda tanımlanmıştır (Lowe ve diğ., 1995). Özellikle *E. faecalis* suşlarında bulunan bu protein, bakterinin konak dokuda çoğalması için gerekli olan mangan transport sistemine bağlanan bir reseptör olarak görev yapmaktadır. Biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunmada da görev aldığı bilinmektedir (Eaton ve Gasson, 2001; Mannu ve diğ., 2003; Kayaoglu ve Orstavik, 2004). Yapılan bir çalışmada, tıbbi ve gıda kaynaklı örneklerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının tümünde *E. faecalis efaA* geninin bulunduğu belirlenmiştir (Eaton ve Gasson, 2001).

2.3.2. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, biyotik ve abiyotik yüzeylerde kolonize olabilen mikroorganizma topluluğudur. Bakterilerde biyofilm oluşumu 5 aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; bakterilerin uygun ortamdaki yüzeylere hareketi ve teması, yüzeye geri dönüşümsüz tutunabilmeleri için ekzopolisakkarit (EPS) madde üretmeleri, biyofilm oluşumu, biyofilm olgunlaşması ve biyofilm tabakasından mikrokolonilerin koparak yeni yüzeylere tutunmasıdır (Şekil 2.4) (Stoodley ve diğ., 2002). Öncelikle, uygun bir ortam bulan planktonik bakteriler yüzey boyunca hareket ederek mikrokoloniler oluştururlar ve yüzeye tutunurlar. Geri dönüşümlü olan bu tutunma, bakterilerin çoğalması ve ekzopolisakkarit madde üretimi ile geri dönüşümsüz bir yapı almaktadır. Biyofilm tabakası içinde gömülü halde bulunan bakteriler, kendi ürettikleri ekzopolisakkarit madde ile soğuk, sıcaklık, kimyasal ajanlar, yüksek tuzluluk ve dezenfektanlar gibi uygunsuz ortam koşullarına karşı dirençlidirler. Quorum Sensing Sistemi ile olgunlaşan biyofilm tabakasından yeterli sayıya ulaşan bakteriler, daha sonra biyofilm tabakasından koparak hayatta kalabilmek ve çoğalabilmek için yeni ortamlara tutunurlar (Aparna ve Yadav, 2008).



Şekil 2.4: Biyofilm oluşum aşamaları (Stoodley ve diğ., 2002).

Mohamed ve Huang tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, ortam koşulları ya da genetik faktörlerle bağlantılı olarak bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm tabakasının kronik endokardit, endodontik ve üriner sistem enfeksiyonlarına yol açtığı belirlenmiştir. Enterokokların biyofilm formasyonunda, pilus, serin proteaz ve jelatinaz enzimleri, Ace yüzey proteini ile *esp* ve *gelE* geninin rolü olduğu ve bu sayede konakçı dokulara tutunabildiği belirlenmiştir (Borgmann ve diğ., 2004; Fisher ve diğ., 2009; Paganelli ve diğ., 2012).

Son yapılan çalışmalarda, Enterokok bakterileri tarafından oluşturulan biyofilm tabakasının hem insan vücudunda hem de tıbbi gereçler başta olmak üzere cansız yüzeylerde meydana gelebildiği, en yaygın olarak ise *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında tespit edildiği belirlenmiştir (Fisher ve diğ., 2009; Paganelli ve diğ., 2012).

2.3.2.1. BopD (Biyofilm Oluşumu)

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip bakteriler olduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşturan Enterokok bakterileri, fagositoza dayanıklıdır. Glukoz bulunan ortamlarda biyofilm oluşumu *bopD* geni tarafından düzenlenmekte olup, osmotik değer farklılıklarından etkilenmektedir. Özellikle *E. faecalis* T9 ve *E. faecalis* V583 suşu tarafından salgılanan bu gen, şeker-bağlayan transkripsiyonel regülatör görevi görmektedir. Aynı zamanda biyofilm oluşumu tamir aşamasında görev alan bu gen, bakteriyel proteinler ile benzerlik göstermektedir (Mohamed ve Huang, 2007).

2.3.2.2. *Fsr (E. faecalis Regülatörü)*

Özellikle *E. faecalis* suşunda, biyofilm oluşumundan sorumlu genler olan *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC*'yi barındıran *fsr* lokusu bulunmaktadır. Özellikle yüzeye tutunma, jelatinaz enzimi sentezinin aktif hale gelmesi ve biyofilm plaklarının oluşmasında etkili olduğu bilinmektedir (Bourgogne ve diğ., 2006; Mohamed ve Huang, 2007).

2.3.2.3. *Ebp (Endokardit Biyofilm İlişkili Pilus)*

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan planktonik bakterilerin yüzeye tutunmasında etkili olan yüzey piluslarının kodlanmasından sorumlu gen bölgesi olup özellikle endokardit enfeksiyonlarından sorumludur (Nallapareddy ve diğ., 2006).

2.3.2.4. *SrtC (SortazC)*

Otolizin, sortaz ve ekstrasellüler DNA'nın, özellikle *E. faecalis* suşunun biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Sortaz, Enterokokların da dahil olduğu Gram pozitif bakterilerin hücre membranlarında yer alan transpeptidaz enzimleridir (Guiton ve diğ., 2009).

2.3.2.5. *Sal (Secretory Antigen Like)*

Cansız yüzeylere ilk tutunmada ve biyofilm oluşumunda görev alan *sal* geni, ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanarak uygunsuz çevre koşullarına (NaCl, SDS, ısı, safra tuzu, etanol, alkalın, asidik ortam vb.) dayanıklılık sağladığı için önemlidir (Mohamed ve diğ., 2004).

2.3.2.6. *Epa (Enterokokkal Polisakkarit Antijen)*

Enterokokkal polisakkarit antijenini kodlayan gen *epa* olarak adlandırmakta olup biyofilm oluşumunda glikozil transferazı kodlamaktadır. Yapılan çalışmalarda *esp* geni mutasyona uğrayan suşlarda biyofilm oluşumunun önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Mohamed ve Huang, 2007).

2.3.2.7. *DltA (D-alanine-D-alanil Taşıyıcı Protein Ligaz)*

Dlt operonunda yer alan *dltA* geni, D-alanin-D-alanil taşıyıcı proteini olan ligazın kodlanmasını aktive ederek teikoik asit üzerinde D-alanin esterlerinin oluşumuna sebep olur. Bu olay sonucunda, geri dönüşümsüz biyofilm oluşumu ve stres koşullarına karşı direnç oluşumu meydana gelir (Mohamed ve Huang, 2007).

2.3.3. Konak Savunma Mekanizmalarını Önleme

Patojen mikroorganizmalar, konak hücreye tutunmada görev alan reseptörlere sahip olması, konağa adezyonu ve kolonizasyonu, bakteriyosin aktiviteleri ve salgıladığı toksinler, intrinsik ve ekstrinsik antibiyotik direnci ve plazmit ve transpozonların aktarımıyla sahip olduğu yeni virulans faktörleri ile konak savunma mekanizmalarını önlemekte ve enfeksiyona neden olmaktadır (Fabretti ve diğ., 2006; Yüksel, 2012).

2.3.3.1. Lipoteikoik Asit (LTA)

Adezyon özelliği gösteren lipoteikoik asitin lipit kısmı, ökaryotik konak hücrenin eritrosit, trombosit, lenfosit, polimorf nüveli lökosit (PMNL) ve epitel hücrelerine bağlanarak agregasyon faktörü oluşumunu indüklemekte ve plazmit transferini kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal direnç gelişmesine de katkı sağlamaktadır. Enterokokların D grubu antijenini oluşturup tümör nekrozis faktör (TNF) ve interferonların salgılanmasını indükleyerek konak doku bağışıklık sistemini olumsuz etkilemektedir (Huycke, 1998; Barbara ve Murray, 1998; Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Fabretti ve diğ., 2006).

2.3.3.2. Ekstrasellüler Süperoksit

Süperoksit, doku hasarına ve lipit, protein ve nükleik asit yapılarının bozulmasına sebep olan bir reaktif oksijen radikalidir. Dışkı kökenli örneklerden ve endokarditli ve bakteriyemili hastalardan izole edilen Enterokok cinsi bakterilerden özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında süperoksit radikallerinin salgılandığı ve çevresel faktörlere karşı bakteride direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Devriese ve diğ., 2006). Yapılan bir araştırmada, 91 klinik izolat ve standart suştan 87'sinin ekstrasellüler süperoksit anyonu ürettiği, enfekte bireylerin dışkı örneklerinden elde edilen ekstrasellüler süperoksitin sağlıklı bireylerin dışkılarından elde edilen örneklere göre çok daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Huycke ve diğ., 1996). Aynı zamanda, Enterokokların süperoksitin hidrojen perokside dönüşümünü sağlayan süperoksit dismutaz enzimine de sahip oldukları belirlenmiştir (Britton ve diğ., 1978; Jett ve diğ., 1994).

2.3.3.3. Enterokok Bakteriyosinleri

'Bakteriyosin' terimi, ilk kez 1953 yılında Jacob ve diğerleri tarafından tanımlanan, ribozomal olarak sentezlenen protein yapısındaki antimikrobiyal maddedir (Jacob ve diğ., 1953). Özellikle laktik asit bakterileri (*Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*,

Enterococcus Streptococcus, Carnobacterium ve *Propionibacterium*) tarafından üretilen bakteriyosin olan ‘nisin’, diğer Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal etki göstermekte ve son yıllarda gıda koruyucusu olarak kullanımı üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bakteriyosinler genellikle fiziksel koşullara ve proteolitik enzimlere karşı dirençlidirler (Tagg ve diğ., 1976; Nes ve diğ., 2007). 1993 yılında Klaenhammer tarafından yapılan sınıflandırmada bakteriyosinler 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

- 1- Sınıf I Bakteriyosinler (Lantibiyotikler): Ribozomal olarak sentezlendikten sonra translasyon aşaması sonrası modifiye olan peptid gruplarıdır.
- 2- Sınıf II Bakteriyosinler: Lantibiyotikler gibi translasyon sonrası modifikasyona uğramayan bunun yerine hücre dışına taşınmaları sırasında bakteriyosin oluşumundan ana bir peptid grubunun ayrılmasıyla meydana gelen peptitlerdir.
- 3- Sınıf III Bakteriyosinler: Yüksek ısı gibi fiziksel şartlara maruz kaldığında kolaylıkla bozunabilen peptid gruplarından oluşan bakteriyosin sınıfıdır.
- 4- Sınıf IV Bakteriyosinler: Aktivasyonu, protein gruplarının kontrolü altında olmayan bakteriyosinlerdir (Klaenhammer, 1993).

Enterokokların ürettiği bakteriyosinler, ‘enterosin’ adıyla tanımlanmış olup, öncelikle *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. mundtii* türleri tarafından üretilmektedir. Bu enterosinlerden Tablo 2.4’de belirtilmiştir (Klaenhammer, 1993; Nes ve diğ., 1996).

Tablo 2.4: Enterokokların ürettiği bakteriyosinler (enterosinler).

Enterokoklarda Bulunan Bakteriyosinler (Enterosinler)
<ul style="list-style-type: none"> • Enterosin A, • Enterosin P, • Enterosin CRL35, • Enterosin 1071A, • Enterosin B, • Enterosin AS-48, • Enterosin EJ97, • Enterosin RJ11, • Enterosin MR10A&B, • Enterosin Q, • Enterosin L50A&B, • Mundtisin KS, • Bakteriyosin 31, • Bakteriyosin 32, • Bakteriyosin RC714, • Bakteriyosin T8, • Enterolislin A

Enterosin olarak adlandırılan Enterokok bakteriyosinleri, pek çok Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı litik aktivite göstermektedir. *E. faecalis* S-48 suşundan izole edilen ve plazmitte kodlanan AS-48 olarak adlandırılan bakteriyosin, diğer bakterilere karşı sitolitik aktivite göstermekle birlikte konak hücrenin sitoplazmik membran iyon geçiş yolağını inhibe ettiği düşünülmektedir (Kayaoglu ve Orstavik, 2004).

2.3.4. Konak İmmun Kaçışta Rol Oynayan Bakteri Hücre Komponenti

2.3.4.1. Kapsül Polisakkarit Antijenleri

Kapsüler polisakkarit antijen yapısı bakteriye, uygun olmayan çevre koşullarına karşı dayanıklı olma, fagositozdan ve immün sistemden kaçma gibi özellikler kazandırmaktadır. Genellikle, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının DNA'sında kodlanan bu operon, konak immün sisteminin baskılanmasında rol oynamaktadır (Gültekin, 2014; Fisher ve Phillips., 2009; Upadhyaya ve diğ., 2009). Xu ve diğ. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, ramnozlu polisakkariti kodlayan gen grubunun Enterokokkal polisakkarit antijeni (*epa*) olarak adlandırıldığı ve patojenitede önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir (Xu ve diğ., 2000; Tendolkar ve diğ., 2003).

2.3.5. Sahip Olduğu Enzimler

Enterokok cinsi bakteriler, virulansta rol oynayan enzimler olan hemolizin, jelatinaz ve hiyaluronidaz enzimleri ile konak dokunun porlarından geçip sitotoksik aktivite gösterirler ve özellikle eritrositler, polimorf nüveli lökositleri (PMNL), makrofajlar, kollajen, fibrinojen, kazein, insülin ve hiyaluronik asit gibi yapılara bağlanarak lizis ederler. Aynı zamanda bu enzimler, rekabetçi floradan olan diğer Gram negatif ve Gram pozitif bakteri yapılarını da parçalayarak patogeneze üstünlük gelişmesine neden olurlar (Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Fabretti ve diğ., 2006).

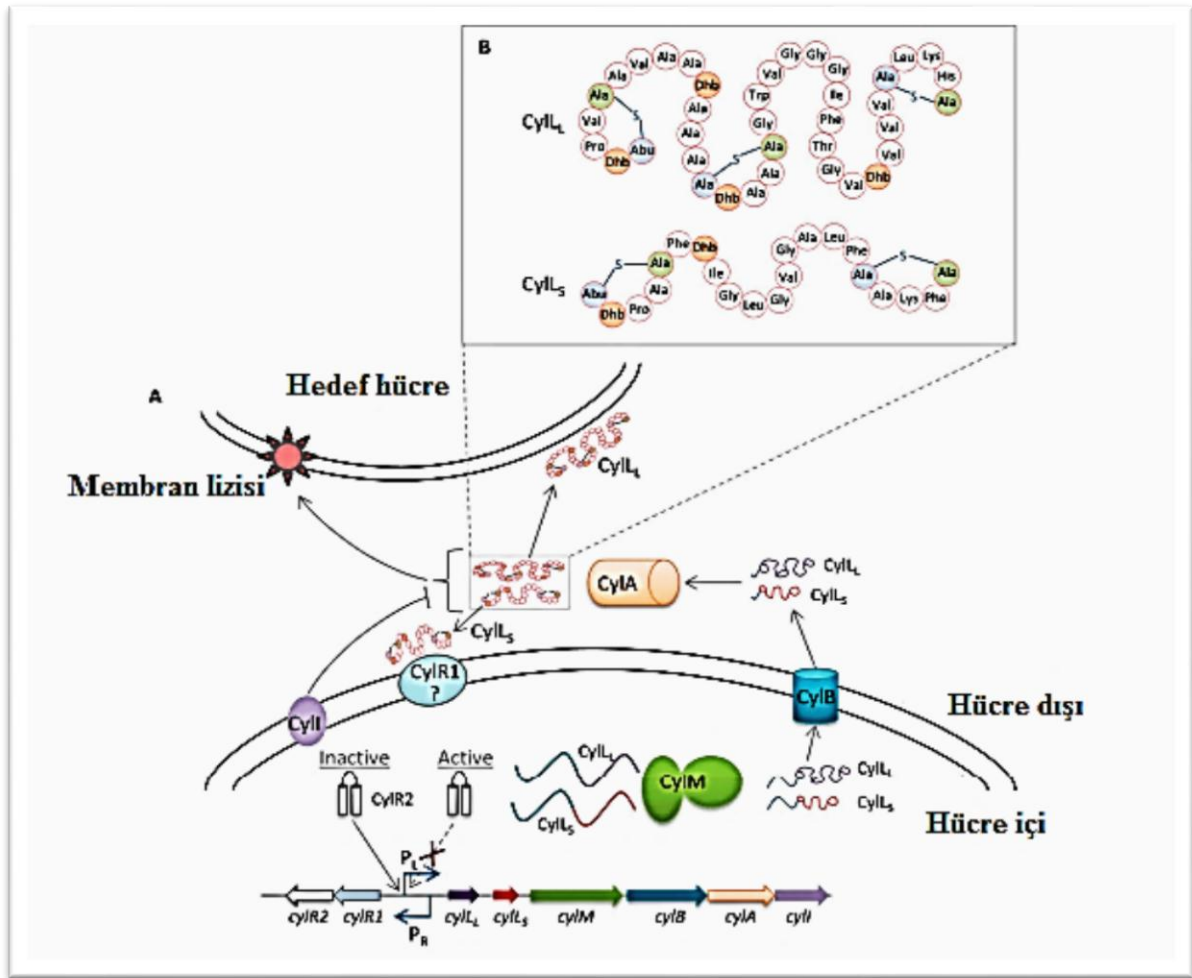
2.3.5.1. Hemolizin/Sitolizin

Hemolizin ya da diğer adıyla sitolizin, bakteri yapısında bulunan sitotoksik proteindir. Hemolizinin, insan, at ve tavşan eritrositlerini, polimorf nüveli lökositleri (PMNL), makrofajları lizis etmesinin yanı sıra bakteriyosin özelliği ile diğer Gram pozitif bakterilere karşı litik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle hemolitik aktiviteden sorumlu gen bölgesi kromozomal DNA ya da plazmit üzerinde taşınabilmektedir (Tailor, 1993; Gültekin, 2004; Upadhyaya, 2009). Sitolizin kodlayan toplam 8 gen bölgesi (*cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*,

cylM, *cylB*, *cylA* ve *cylI*) bulunmaktadır (Şekil 2.5) (Gilmore ve diğ., 1990; Haas ve diğ., 2002).

Son yıllarda, lantipeptit grubuna dahil edilen ve quorum sensing mekanizması ile ilişkili olduğu belirlenen sitolizinler, Cyl_{L_S} ve Cyl_{L_L} olmak üzere iki ana yapıdan oluşmaktadır. Sitolizin operonu, bakteriyel kromozomda ya da pAD1 plazmitinde kodlanmakta olup 8 gen (*cylR₁*, *cylR₂*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylL_M*, *cylL_B*, *cylL_A* ve *cylL_I*) içermektedir. *cylL_L* (uzun alt ünite) ve *cylL_S* (kısa alt ünite) genleri sitolizin alt ünitesinde kodlanan genler, *cylL_M*, *cylL_B* ve *cylL_A* genleri post-translasyonel mekanizma ile düzenlenen salgısal genler ve immun kaçışta rol oynayan *cylL_I* geni olup bir operon tarafından kodlanmakta iken, *cylR₁* ve *cylR₂* genleri ise düzenleyici genler olup farklı bir operon tarafından kodlanmaktadır (Coburn ve diğ., 2004). İlk olarak ribozomlarda üretilen ve lizisten sorumlu olan *cylL_L* ve *cylL_S* genleri, *cylL_M* tarafından lantionin ve metillantionin köprülerinin oluşmasıyla post-translasyonel modifikasyona uğramakta ve inaktif halde CylB ile hücre dışına taşınmaktadır. Serin proteaz yapısında olan CylA ile aktif hale gelerek hücre dışına taşınmaktadır. Sitolizin alt ünitelerinden olan *cylL_I* geni ise bakteri hücrelerini, konak immun sistemden korumaktadır (Coburn ve diğ., 1999; Tyne ve diğ., 2013). Tüm sitolizin genleri, konak hücre zarında porlar oluşturur ve eritrositler, makrofajlar ve Gram pozitif bakterileri lizis eder (Coburn ve Gilmore, 2003). Yapılan çalışmalarda, düzenleyici genler olan *cylR₁* ve *cylR₂*'nin varlığında sitolizin üretimi baskılanırken, *cylL_S* geni hücre dışında eşik değerine ulaştığında sitolizin üretiminin uyarıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte sitolizin üretiminin çevresel koşullardan etkilendiği ve anaerobik ortamlarda sitolizin salınımının arttığı saptanmıştır (Haas ve diğ., 2002).

Yapılan çalışmalarda, sitolizin operonunun *esp* ve *agg* virulans genleri ile de benzer mekanizmaya sahip olduğu belirlenmiştir (Clewell, 1993; Jett ve diğ., 1994; Haas ve diğ., 2002; Devriese ve diğ., 2006).



Şekil 2.5: Enterokoklarda sitolizin üretimi. **A:** *cyiL* ve *cyiS* tarafından kodlanan toksin yapılı bileşikler [Cyl_L (büyük alt ünite) ve Cyl_S (küçük alt ünite)], **B:** Sitolizin alt ünitelerini oluşturan Cyl_L ve Cyl_S yapısı (Gilmore ve diğ., 1990; Haas ve diğ., 2002).

2.3.5.2. Jelatinaz

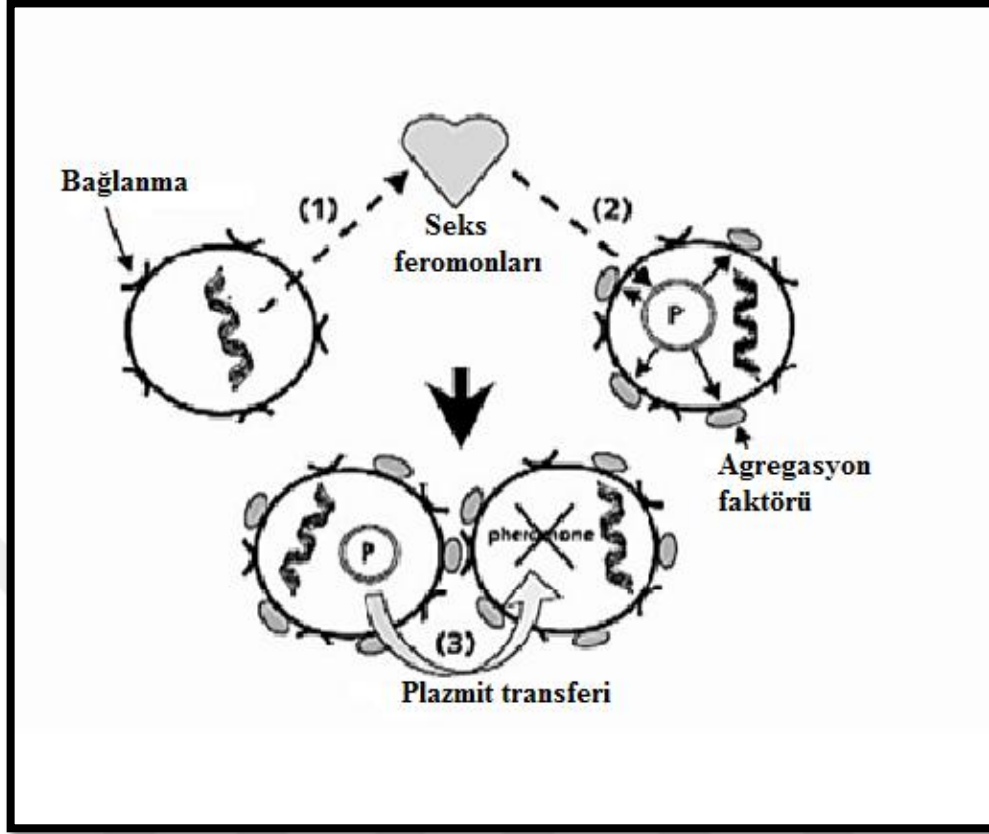
fsr gen bölgesinin regüle ettiği jelatinaz enzimi, matriks metalloproteinaz (MMP) grubundan çinko içeren bir enzim olup ilk kez Bleiweis ve Zimmerman (1964) tarafından *E. faecalis* OG1RF suşunda belirlenmiştir (Qin ve diğ., 2000). Jelatinaz enzimi, jelatin, kollajen, fibrinojen, kazein, hemoglobin, insülini lizis edebilmektedir. Endokarditli hastalardan ve fekal kaynaklı örneklerden izole edilen *E. faecalis* suşlarında tespit edilmiş olup konak dokularda toksik etki oluşturmaktadır (Gültekin, 2014). Yapılan bir çalışmada, dışkı örneklerinin %53'ünde ve endokarditli hastalardan alınan örneklerin tamamında (% 100) *fsr* geninin varlığı tespit edilmiştir (Upadhyaya ve diğ., 2009).

2.3.5.3. Hiyaluronidaz

Hiyaluronidaz enzimi, konak dokudaki hyaluronik asidi parçalayarak doku hasarına sebep olur, aynı zamanda bakteri yayılımını hızlandırmakta ve *hyl* geninde kodlanmaktadır. Enterokoklar, Streptokoklar ve Stafilokoklarda bulunan bu gen aynı zamanda kancalı kurtlar, sülükler, zehirli yılanlar ve spermatozoa gibi ökaryotik hücrelerde de bulunmaktadır. Bakteri kromozomlarında kodlanan *hyl* geni, hyaluronik asitin kimyasal yapısını bozup parçalayarak bakterinin üremesi için besin kaynağı oluşturur ve kolonizasyonunu sağlar. Aynı zamanda, bakteriyel toksinlerin salınmasını uyararak özellikle bağ doku hücreleri ve diş kök kanallarında inflamatuvar reaksiyonlar başlatır ve apse oluşumuna sebep olur. Özellikle *E. faecium* türünde bulunduğu belirlenen *hyl* geni invaziv enfeksiyonlarda rol oynamaktadır (Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Fabretti ve diğ., 2006).

2.3.6. Seks Feromonları

Enterokok suşları ve diğer bakteriler arasında plazmit DNA'sının konjugasyonla aktarımını sağlayan seks feromonları sayesinde, antibiyotik direnç genleri ve sitolizin gibi virulans faktörü genleri kolayca aktarılabilir. Alıcı hücreden salgılanan seks feromonları verici hücrede agregasyon faktörü uyararak konjugasyonu başlatır, böylelikle bakteriler arasında virulans genlerinin aktarımı gerçekleşmiş olur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Virulans faktörlerinin seks feromonu ile aktarımı (Kayaoglu ve Orstavik, 2004).

Başta *E. faecalis* türlerinde bulunan seks feromonlarının *cpd*, *cob*, *ccf* ve *cad* genlerinde kodlandığı belirlenmiştir. Antibiyotik direnç ve virulans genlerinin aktarımından sorumlu seks feromonları dışındaki diğer seks feromonları nötrofillere bağlanıp bakteride süperoksit üretimini ve lizozomal enzim salgılanmasını arttırmaktadır. Böylelikle konak dokuda hasara sebep olur ve inflamatuvar yanıtı arttırmaktadırlar. Antibiyotik direnç ve virulans genlerinin pek çoğunun yatay gen transferinin seks feromonları ile sağlandığı belirlenmiştir (Chung ve diğ., 1995; Kayaoglu ve Orstavik, 2004; Koneman ve diğ., 2005, Çetinel Aksoy, 2008).

2.4. ENTEROKOKLARDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI

Yapılan çalışmalarda, 1940'lı yıllarda antibiyotiğin kullanılmadığı bazı bölgelerde, toprak ve dışkı örneklerinden izole edilen örneklerde tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli bakterilerin bulunduğu belirtilmiş ve çalışma sonucunda, uygunsuz çevre koşullarında, bakterinin canlılığını sürdürebilmesi ve çoğalabilmesi için savunma mekanizması olarak direnç geliştirebildiği bildirilmiştir (Yuce ve diğ., 2001).

Bilinçsiz antibiyotik kullanımı, plazmit ve konjugatif transpozonlarla antibiyotik direnç genlerinin aktarımı, bakterilerde çoklu antibiyotik direncine (ÇAD) neden olmakta ve konakta süperenfeksiyonlara yol açmaktadır. Bakterilerin bazıları, antibiyotiğin kimyasal reaksiyona girdiği enzim ya da metabolik yapılarındaki değişimlerle antibiyotiğin bağlanmasını engellerken, bazıları ise folat sentezinin engellenmesi, bakterilerin oluşturduğu biyofilm ile antibiyotik geçirgenliğinin azalması, biyofilm tabakasındaki bakterilerin VBNC (viable but non-culturable) fazına girmesi ve biyofilm tabakasındaki kimyasal değişiklikler sonucu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedirler. Bu direnç mekanizması sayesinde bakterilerin, trimetoprim, sulfonamidler başta olmak üzere pek çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir (Costerton ve diğ., 1999; Mah ve O'Toole, 2001; Çiftçi ve Aksoy, 2015). Mikroorganizmaların antibiyotiklere çeşitli savunma mekanizmalarıyla direnç geliştirdiği saptanmıştır. Bu direnç mekanizmaları;

- 1- Bakteri hücresi içine antibiyotik girişinin engellenmesi ile gelişen direnç,
- 2- Antibiyotik inaktivasyonu sonucu gelişen direnç,
- 3- Hedef molekülün değişimi ile gelişen direnç,
- 4- Aktif pompa sistemleri ile gelişen direnç,
- 5- Diğer mekanizmalar ile gelişen direnç (Çiftçi ve Aksoy, 2015) olmak üzere 5 grup altında incelenmektedir.

Bakteriler kromozomal olarak, plazmitlerle, konjugatif transpozonlar, mutasyonlar ya da insersiyon dizileri sayesinde antibiyotik direnç ve virulans genlerine sahip olup tür içi ya da türler arasında bu genleri aktarabilmektedir.

Bakterilerde antibiyotik direnci, intrinsik (doğal-kromozomal) ve ekstrinsik (kazanılmış) olmak üzere 2 mekanizma ile gerçekleşmektedir. Mikroorganizmanın kromozomal DNA'sında bulunan ve kalıtsal olarak meydana gelen direnç mekanizmasına 'intrinsik direnç' denilmektedir. Konjugatif plazmitler ve transpozonlar tarafından edinsel olarak meydana gelen antibiyotik direnç mekanizmasına da 'ekstrinsik direnç' denilmektedir. Enterokoklar kazandıkları bu ekstrinsik direnç ile, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, aminoglikozitler, linkozamid, β -laktam grubu antibiyotikler, kinolonlar ve glikopeptitlere direnç kazanmışlardır. Yapılan çalışmalarda, özellikle son yıllarda yüksek düzey aminoglikozit, β -laktam ve glikopeptit grubu antibiyotiklere karşı oluşan direncin, Enterokok kaynaklı enfeksiyonlar ve nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde sorun oluşturduğu

bildirilmektedir (Cetinkaya ve diğ., 2000; Klare, 2003; Meriç ve diğ., 2004; Teixeria ve diğ., 2009).

Enterokoklarda intrinsik ve ekstrinsik antibiyotik direnç mekanizmaları Tablo 2.5'te gösterilmiştir (Robert ve Moellering, 2005).

Tablo 2.5: Enterokokların intrinsik ve ekstrinsik dirençli olduğu antibiyotikler (Robert ve Moellering, 2005).

İntrinsik (Doğal-kromozomal Direnç)	Ekstrinsik (Kazanılmış Direnç)
<ul style="list-style-type: none"> • Aminoglikozid direnci (düşük düzey) • β-laktamlar (yüksek MİK değeri) • Linkozamidler (düşük düzey) • Trimetoprim-sulfametoksazol • Kinupristin/dalfopristin (<i>E. faecalis</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Aminoglikozid direnci (yüksek düzey) • β-laktamlar (penisilin, ampisilin vb.) • Hücre duvarına etkili antibiyotiklere direnç (tolerans geliştirmeyeyle) • Florokinonlar • Linkozamidler (yüksek düzey) • Makrolidler • Rifampisin • Tetrasklin • Vankomisin • Kinupristin/Dalfopristin • Linezolid

2.4.1. β -laktam Direnci

β -laktam antibiyotiklere direnç, Enterokoklardaki penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) varlığı ile ilişkilidir. Enterokoklarda bulunan penisilin bağlayan protein 5 (PBP5) enzimi, β -laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. Hücre duvarının transpeptidasyon aşamasında görevli olan β -laktam grubu ajanlar, bakterisidal etkiye sahip olup başlıca 3 mekanizma ile direnç gelişimini sağlamaktadırlar (Suppola ve diğ., 1999).

Bu mekanizmalar;

- 1- β -laktamaz grubu enzimler ile antibiyotiğin hedef bölgeye ulaşmadan lizisine neden olan mekanizma,
- 2- Hücre duvarı transpeptidazların, antibiyotiğin hedef konumunu değiştirmesi,
- 3- Hücre duvarı permeabilitesinin değişmesi ve Efluks pompaları ile antibiyotiğin hedefe ulaşmasının engellenmesidir (Meriç ve diğ., 2004).

Üretilen beta-laktamaz enzimleri ile Gram negatif, Gram pozitif ve *Mycobacterium* cinsindeki bakterilerin pek çoğunun, başta penisilinlere ve sefalosporinlere direnç gösterdiği

belirlenmiştir. Gram pozitif bakteriler olan *Staphylococcus* ve *Enterococcus* cinsi bakterilerde virulans faktörü olan beta-laktamaz enzimi, penisilin ve ampisilinlere direnç gelişimine neden olmaktadır (Rice ve Goldstein, 1991). *E. faecium* türlerinde ampisilin ve beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç, beta-laktam grubu antibiyotiklerin bağlanma afinitesini azaltan aşırı PBP5 üretimi ve beta-laktam grubu antibiyotiklerin bağlandığı D, D-transpeptidazlar yerine L, D-transpeptidazların üretimi ile gerçekleşmektedir (Zapun ve diğ., 2008).

Enterokoklar, β -laktam grubu antibiyotiklerden sefalosporinlere daha dirençli olduğu için tedavide sefalosporin yerine penisilin kullanılması daha uygun görülmüştür (Suppola ve diğ., 1999). Klinik örneklerden izole edilen bakteriler başta olmak üzere, *E. faecium* suşunun *E. faecalis*'e göre penisilin direncinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 1-8 $\mu\text{g/ml}$ penisilin *E. faecalis* izolatlarında bakterisidal etki oluştururken, *E. faecium* izolatlarında bu oran 16-64 $\mu\text{g/ml}$ 'dir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *E. faecium* PBP'lerinin penisiline bağlanma kapasitesinin azaldığı bunun yerine ampisiline direnç geliştirdikleri belirlenmiştir (Barbara ve Murray, 1998; Marothi ve diğ., 2005). Fontana ve diğ. (1985) yaptıkları çalışmada, *E. faecium* suşunun PBP5 enzimini üretme yeteneklerini kaybettikleri bu nedenle penisiline duyarlı hale geldikleri belirlenmiştir. β -laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç mekanizmaları sayesinde, bu antibiyotikler Enterokoklar üzerinde bakterisid etki yerine bakteriyostatik etki oluşturmaya başlamıştır.

Enterokoklar, β -laktam grubu antibiyotiklere intrinsik direnç kazanmalarının yanında plazmit aracılı ekstrasik direnç de kazanabilmektedirler. Enterokoklarda bulunan, özellikle gentamisine yüksek düzey direnç geni taşıyan plazmitlerle transfer olan β -laktamaz enzimi sayesinde penisilin, ampisilin gibi antibiyotikler hidrolize olur (Derbentli, 1998).

2.4.2. Aminoglikozit Direnci

Enterokok bakterileri sitokrom enzimlerine sahip olmadıklarından hücre içine antibiyotik girişinde harcanacak olan enerjiyi üretemezler, bu durum sonucunda aminoglikozitlere düşük seviyede direnç göstermektedirler. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde β -laktam grubu gibi hücre duvarına etkili antibiyotiklerle beraber kullanıldığında sinerjistik etki sonucu bakterisidal etki oluşmaktadır (Arias ve Murray, 2013).

Enterokoklarda aminoglikozit direnci 3 mekanizma ile gerçekleşmektedir:

- 1- Permeabiliteye bağlı direnç: Enterokok kromozomlarında gerçekleşen bir mutasyonla hücre membranındaki permeabilitenin azalması ile gelişebilen dirençtir. Bu tip direnç mekanizmasını önlemek için, aminoglikozidler β -laktam grubu antibiyotiklerle beraber kullanılabilir (Mohanty ve diğ., 2005; Albakkour, 2013).
- 2- Aminoglikozit modifiye edici enzimlere (AME) bağlı direnç: Kazanılmış (ekstrinsik) direnç içerisinde incelenmekte olup, plazmit veya transpozonlar tarafından kodlanan veya aktarılan ve aminoglikozidleri modifiye ve inaktive edici enzimler olan aasetiltransferaz (AAC), adeniltransferaz (ANT), fosfotransferaz (APH) enzimleri tarafından gerçekleştirilen direnç mekanizmadır (Kariyama ve diğ., 2000; Kobayashi ve diğ., 2001). Enterokokların da sahip olduğu enzimatik süreçte görev alan 6'-asetiltransferaz-2-fosfotransferaz enzim bileşiği streptomisin hariç tüm aminoglikozidlere (amikasin, gentamisin, tobramisin ve netilmisin) direnç gelişmesinde önemli bir role sahiptir. Sadece streptomisine karşı gelişen direnç ise 6'-adeniltransferaz (AAD6) sayesinde gerçekleşmektedir. *E. faecalis* suşlarında düşük düzeyde de olsa aminoglikozit direnci olup β -laktam grubu antibiyotiklerle bu direnç mekanizması azalmaktadır. *E. faecium* ise *aac(6')* geni tarafından kodlanan 6'-asetiltransferaz (AAC-6') enzimine intrinsik olarak sahip olduğundan tobramisin, kanamisin, netilmisin ve sisomisini modifiye eden antibiyotik direnç mekanizmasına sahiptir. Enterokoklardaki yüksek düzey aminoglikozit direnci ekstrinsik olarak kazanılmış olup, tedavide kombine antibiyotik uygulansa bile sinerjistik etki göstermez (Kapoor ve diğ., 2005; Mohanty ve diğ., 2005; Albakkour, 2013).
- 3- Ribozomal direnç: Ribozomal direnç bakteriler arasında nadir görülmekle birlikte, ribozomlarda meydana gelen aminoasit değişikliği, ribozomun anitibiyotiğe olan bağlanma kabiliyetini azaltmaktadır (Gold ve diğ., 1993).

2.4.3. Trimetoprim-Sulfametoksazol (TMP-SMX) Direnci

Enterokoklar, ekzojen kaynaklı folik asit, dihidrofolat ve tetrahidrofolatı kullanabilmektedirler. Enterokoklar TMP-SMX' karşı *in vitro* olarak duyarlı olsalar bile *in vivo* çalışmalarda duyarsız oldukları belirlenmiştir. Bu durum sonucunda, antibiyotik duyarlılık testlerinde TMP-SMX kullanımını uygun görülmemektedir (Gültekin, 2004; Wilke, 2008).

2.4.4. Linkozamidlere Direnç

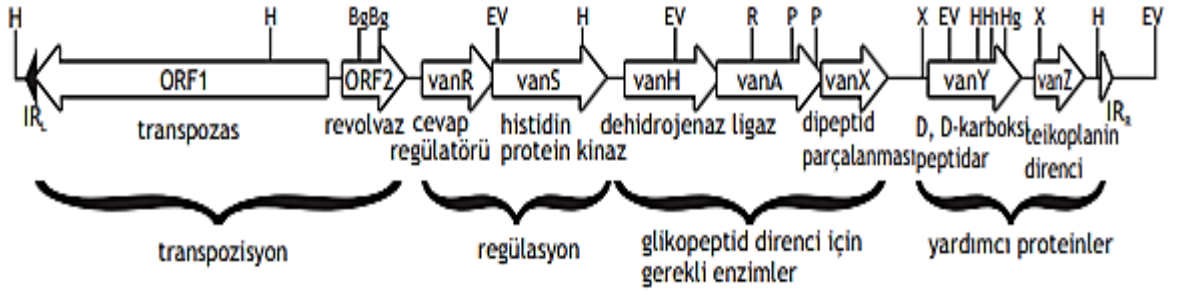
Enterokokların linkozamid ve klindamisine, intrinsik olarak düşük düzeyde direnç gösterdiği bilinmektedir (Gültekin, 2014).

2.4.5. Kinupristin/dalfopristin Direnci

E. faecalis, intrinsik yolla kinupristin/dalfopristine karşı dirençli iken, *E. faecium*'da ise son yıllarda direnç geliştiği tespit edilmiştir (Tünger, 2012).

2.4.6. Glikopeptit Direnci

Dünya'da ilk glikopeptit direnci 1988 yılında Uttley ve diğ. tarafından bildirilmiştir. Türkiye'de ise ilk kez Vural ve diğ., 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde bir hastadan vankomisin dirençli Enterokok (VRE) izole ettiklerini bildirmişlerdir. Enterokok bakterilerinde hücre duvar yapısı hedef molekül yapısal ve kimyasal değişikliklerle vankomisin ve ampisiline karşı direnç geliştiği belirlenmiştir. Bakteri hücre duvarında vankomisin bağlanan hedef molekül olan D-ala-D-ala yapısının D-alanil-D-laktat veya D-alanil-D-serin yapısına dönüşmesi sonucunda vankomisin direnci meydana gelmektedir. Gram pozitif koklar başta olmak üzere pek çok bakteride kromozomlarda meydana gelen doğal direnç (VanC tipi direnç) ya da replikon ve transpozon genlerde meydana gelen kazanılmış direnç (VanA, B, C, D, E ve G) mekanizmaları ile vankomisine direnç gelişmektedir (Şekil 2.7). Vankomisin direnci özellikle nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan sorunlar arasındadır (Çöleri ve Çökmüş, 2008). Sadece Gram pozitif bakterilere etkili olan glikopeptitler, hücre duvarı sentezinden sorumlu olan D-ala-D-ala terminal ucuna bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe ederler (Uttley ve diğ., 1988; Shepard ve Gilmore, 2002; Gülay, 2002). Vankomisine karşı direnç daha önceki çalışmalarda MİK değerine göre yorumlanmakta iken günümüzde, hücre duvarı peptidoglikan tabakası yapımında görev alan D-ala-D-ala yapısını ligaz enzimi ile D-ala-D-ala-laktat veya D-ala-D-ala-serin oluşumuna modifiye ettiklerinden moleküler çalışmalarla ligaz enzimi üretimine bakılmasının daha doğru olduğu sonucuna varılmıştır (Fang ve diğ., 2010).



Şekil 2.7: Enterokoklarda vankomisin direnci. **IR_L** ve **IR_R**: sol ve sağ inverted tekrarları, **B**: *Bam*HI; **Bg**: *Bg*III, **EI**: *Eco*RI, **EV**: *Eco*RV, **H**: *Hind*III, **P**: *Pst*I, **X**: *Xba*I restriksiyon enzimi kesim bölgeleri (Fang ve diğ., 2010).

Kromozomlarda çeşitli etkenler sonucu meydana gelen mutasyonlar, plazmit ve transpozon transferi gibi etkenlerle, Enterokoklar vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptitlere karşı direnç kazanmışlardır. VRE suşları, nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde sorun teşkil etmekte olup, 6 tip glikopeptid direnci (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG) tanımlanmış olup son yıllarda VanL ve VanM olmak üzere 2 vankomisin direnç tipi daha eklenmiştir. Enterokok vankomisin direncine ait bilgiler Tablo 2.5'te gösterilmiştir (Gilmore, 2002; Fisher ve Phillips, 2009; Yüksel, 2012).

VanA tipi direnç: İlk olarak *E. faecium* suşunda tespit edilen ve *vanA* geni tarafından kodlanan yüksek düzeyde vankomisin (MİK>64 µg/ml) ve teikoplanin direnci (MİK>16 µg/ml) olup Enterokoklarda en sık görülen glikopeptid direncidir. Enterokok kromozomu üzerinde bulunabildiği gibi, Tn1546 transpozonu aracılığıyla ekstrasik olarak da kazanılmış bir direnç olup tüm Enterokok suşları arasında transferi gerçekleştirilebilmektedir (Gilmore, 2002; Williams ve Hergenrother, 2008).

VanB tipi direnç: Enterokok kromozomları üzerinde (intrinsik) bulunan bu direnç geni, aynı zamanda Tn1546 ve Tn5382 transpozonları arasında konjugasyonla aktarımla da meydana gelen ekstrasik gendir. Hücre duvarı peptidoglikan sentez basamağını ligaz enzimi ile D-ala-D-ala-lac şeklinde modifiye eder (Gilmore, 2002; Klare ve diğ., 2003). Bu direnç tipinde, vankomisine direnç MİK>32-64 µg/ml iken teikoplanine duyarlılık vardır ve sadece *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında görülmektedir (Çiçekler Tok, 2006).

VanC tipi direnç: İntrinsik direnç olup transfer edilemediği belirlenmiştir ve bu direnç tipinde MİK>4-32 µg/ml iken teikoplanine duyarlılık görülür. *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. gallinarum* suşunda görülmektedir (Bilgehan, 2000; Gültekin, 2014).

VanD tipi direnç: İlk kez 1991 yılında *E. faecium* suşunda tanımlanan VanD tipi direnç, MİK>64-256 µg/ml değeri ile vankomisine, MİK>4-32 µg/ml değeri ile teikoplanine dirençlidir. İntrinsik olarak bulunan bu direnç geni diğer Enterokok türleri arasında konjugasyonla transfer edilemez (Başustaoğlu, 2004; Sayiner, 2008; Togay ve diğ., 2010).

VanE tipi direnç: İlk kez *E. faecalis* BM4405 suşunda tanımlanmış olup MİK=16 µg/ml değeri ile vankomisine direnç gösterirken, MİK=0.5 µg/ml değeri ile teikoplanine duyarlıdır. İntrinsik olduğu belirlenen bu direnç geni, ligaz enzimi ile hücre duvarı sentezinin peptidoglikan basamağını D-ala-D-ala-ser ile sonlanan prekürsörler ile modifiye etmektedir. VanE tipi direnç geni konjugasyonla diğer Enterokok türleri arasında transfer edilemez (Robert ve Moellering, 2005; Xu, 2000).

VanG tipi direnç: İlk olarak *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmış olup MİK=16 µg/ml değeri ile vankomisine direnç gösterirken, MİK=0.5 µg/ml değeri ile teikoplanine duyarlıdır. Bu direnç geni, diğer Enterokok türleri arasında konjugasyonla aktarılamayıp nadir görülmektedir (Başustaoğlu, 2004; Sayiner, 2008; Togay ve diğ., 2010).

VanL tipi direnç: İlk kez *E. faecalis* BM4405 suşunda tanımlanmış olup MİK=16 µg/ml değeri ile vankomisine direnç gösterirken, MİK=0.5 µg/ml değeri ile teikoplanine duyarlıdır. İntrinsik olduğu belirlenen bu direnç geni, ligaz enzimi ile hücre duvarı sentezinin peptidoglikan basamağını D-ala-D-ala-ser ile sonlanan prekürsörler ile modifiye etmektedir (Vergidis ve Falagas, 2008).

VanM tipi direnç: İlk kez 2010 yılında *E. faecium* suşunda tanımlanmış olup, hücre duvarı sentezinin peptidoglikan yapımı aşamasını ligaz enzimi ile D-ala-D-ala-lac prekürsörü ile modifiye edip konjugasyonla diğer Enterokok türleri arasında aktarımı gerçekleştirilebilen bir direnç genidir. VanM tipi direncin sahip olduğu ligaz geni 1032 baz çifti uzunluğunda olup diğer vankomisin direnç tipleri ile ortak aminoasitler içermektedir (Gallagher ve diğ., 2009).

Enterokoklarda vankomisin direnç tipleri Tablo 2.6'da gösterilmiştir (Gilmore, 2002; Fisher ve Phillips, 2009; Yüksel, 2012).

Tablo 2.6: Enterokok vankomisin direnç tipleri (Gilmore, 2002; Fisher ve Phillips, 2009; Yüksel, 2012).

Genotip	Vankomisin MİK (µg/ml)	Konum	Öncü
<i>vanA</i>	64-1000	Plazmit ya da kromozom	D-ala-D-ala-lac
<i>vanB</i>	4-1000	Plazmit ya da kromozom	D-ala-D-ala-lac
<i>vanC</i>	2-32	Kromozom	D-ala-D-ala-ser
<i>vanD</i>	64-168	Kromozom	D-ala-D-ala-ser
<i>vanE</i>	16	Kromozom	D-ala-D-ala-ser
<i>vanG</i>	<16	Kromozom	Bilinmiyor
<i>vanL</i>	16	Bilinmiyor	D-ala-D-ala-ser
<i>vanM</i>	16	Bilinmiyor	D-ala-D-ala-lac

Enterokoklarda glikopeptit direnci, sadece Enterokok türleri içi veya türler arasında değil, farklı cinslerden patojenlere de aktarılabildiği için oldukça önemlidir (Çöleri ve Çökmüş, 2008).

2.4.7. Kloramfenikole Direnç

Enterokoklarda, kloramfenikole direnç, asetiltransferaz (CAT) enzimi tarafından gerçekleşmekte olup bu enzim kloramfenikolde asetillenmeye sebep olarak ribozomlara bağlanmasını engeller. CAT enzimi Enterokoklarda hem kromozomlar üzerinde bulunmakta olup hem de konjugatif ve konjugatif olmayan plazmitlerle taşınmaktadır. Enterokoklardaki kloramfenikole direnç oluşumunu sağlayan *cat_{pIP501}* geni, Streptokoklarda bulunan pIP501 plazmiti üzerindeki kloramfenikol asetiltransferaz direnç geni ile aynı olup *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında bulunduğu belirlenmiştir. Bu gen, Enterokoklar dışında Streptokoklar ve Stafilokoklarda da bulunduğu için *cat_{pIP501}* direnç geninin horizontal transfer ile aktarıldığı belirlenmiştir. Enterokoklar bu direnç geninin dışında, Efluks pompası ile enerji harcanarak kloramfenikölü hücre dışına atarak direnç geliştirmişlerdir (Gilmore, 2002; Wax ve diğ., 2008).

2.4.8. Makrolidlere Direnç

Enterokoklarda makrolidlere direnç, kromozomlarda gerçekleşen nokta mutasyonları, 23S rRNA metilasyonu ile protein sentezi blokasyonu sonucu makrolidlerin bağlanmasının engellenmesi, makrolidlerde bulunan lakton halkasının hidrolizi ve makrolidlerin Efluks

pompası ile hücreden atılması olmak üzere 4 direnç mekanizması sayesinde meydana gelmektedir. Makrolid direnç geni olan *ermB*, kromozomlarda bulunmakla birlikte Tn917 transpozonu ile transfer edilebilmekte ve horizontal gen transferi ile de yayılabilmektedir (Wegener ve diğ., 1999; Wax ve diğ., 2008).

2.4.9. Tetrasiklinlere Direnç

Enterokoklar tetrasiklinlere direnç, antibiyotik metilasyonu ile ribozomlara bağlanmasının engellenmesi (*tetM*, *tetO* ve *tetS* genleri ile) ve enerji bağımlı Efluks pompası sayesinde antibiyotiğin hücre dışına atılmasıyla (*tetK* ve *tetL* genleri ile) gerçekleşmektedir. Bunların dışında *tetU* geni son yıllarda keşfedilmiş olup mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Enterokoklarda yaygın olarak bulunan *tetM* geni kromozomlar üzerinde yerleştiği ya da Tn916 konjugatif transpozonu ile taşındığı belirlenmiştir (Aarestrup ve diğ., 2000; Huys ve diğ., 2004).

2.4.10. Florokinonlara Direnç

Bakterilerde bulunan DNA giraz ve topoizomeraz IV, florokinonlarla kompleks oluşturma yeteneğinde olup DNA'nın replike olmasını engeller ve bakterisidal etki oluştururlar. Florokinonlara direnç, GyrA (DNA giraz alt ünitesi) ve ParC (Topoizomeraz IV alt ünitesi) bölgelerinde meydana gelen mutasyonlarla meydana gelebilmektedir. Enterokoklarda florokinonlara direnç yaygın olup, enerji bağımlı Efluks pompasıyla (*E. faecalis*'te EmeA, EfrAB ve Lsa) da gelişebilmektedir. *E. faecalis*'te tanımlanmış olan *efrAB* direnç geni florokinonlara direnç geliştirmekten sorumlu olup aynı zamanda, siprofloksasin ve norfloksasinin MİK değerini dört kat arttırdığı saptanmıştır (Wax ve diğ., 2008).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. DENEYDE KULLANILAN BAKTERİLER

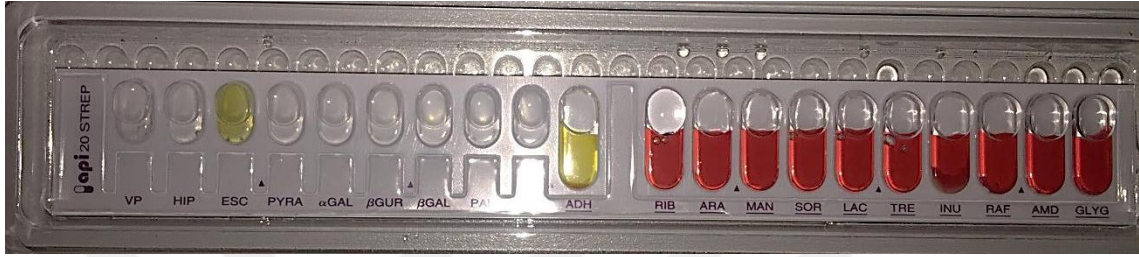
Çalışma kapsamında, daha önce yapılan bir çalışmada (Kimiran Erdem ve diğ., 2007) deniz suyundan izole edilen 66 *Enterococcus* suşu kullanılmıştır. -80 °C'de saklanan stok kültürlerin canlandırma ve doğrulama işlemlerinin yapılması için, suşların Triptik Soy Agar (TSA) (Merck, Germany) besiyerine ekimleri yapılmış ve 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası TSA besiyerinde tek düşen koloniler Gram boyama yöntemi ve katalaz testi ile incelenmiştir. Gram pozitif kok görünümünde, katalaz testi negatif koloniler daha sonra Bile Esculin Agar (Oxoid, UK) besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda Bile Esculin Agar besiyerinde üreyen ve eskulini hidrolize ederek siyah halo ile çevrelenmiş koloniler *Enterococcus* olarak kabul edilmiştir.

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının fenotipik ve genotipik virulans faktörlerinin incelenmesinde pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (American Type Culture Collection, USA) kullanılmıştır.

3.2. ENTEROKOK SUŞLARININ API®20 STREP TEST KİTİ İLE TANIMLANMASI

Deniz suyundan izole edilen Gram pozitif kok, katalaz negatif, Bile Esculin Agar (Oxoid, UK) besiyerinde siyah halo ile çevrelenmiş koloni oluşturan 66 Enterokok suşuna ait tür tayini, 20 mikrotüpten oluşan API®20 Strep (Biomeriux, France) test sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). API®20 Strep (Biomeriux, France) ticari biyokimyasal test sisteminde sodyum piruvat hidrolizi (VP), hippurik asit hidrolizi (HP), eskulin hidrolizi (ESC), aminoasit metabolizması (PYRA, α -GAL, β -GUR, β -GAL, PAL, LAP, ADH), fermentasyon özellikleri (D-riboz, L-arabinoz, D-mannitol, D-sorbitol, D-laktoz, D-trehaloz, inulin, D-rafinoz, nişasta hidrolizi, glikojen metabolizması) ve strip dışında hemoliz aktivitesi incelenmiştir. Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşu, Mc Farland No. 4 bulanıklık

serisine göre hazırlanmış ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda striplerdeki kuyucuklara eklenmiştir. Tüm örnekler, 37 °C’de, ilk okuma için 4 saat inkübasyona bırakılmış ve gerekli ayıraçlar eklendikten sonra ikinci okumanın değerlendirilmesi için 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda üretici firmanın talimatları doğrultusunda, Enterokok suşlarının biyokimyasal olarak tür tayini değerlendirilmesi yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır.



Şekil 3.1: 20 mikrotüpten oluşan API® 20 Strep (Biomeriux, France) test sistemi.

3.3. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ

3.3.1. Antibiyotik Duyarlılık/Dirençlilik Profillerinin İncelenmesi

3.3.1.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Deniz suyundan izole edilen Enterokok cinsi bakterilerin antibiyotik duyarlılık/dirençlilik profillerinin incelenmesi amacıyla, Bile Esculin Agar (Oxoid) Besiyerinde siyah renk oluşturan 66 Enterokok suşu Nutrient Agar (Oxoid, UK) Besiyerine azaltma yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tek düşen kolonilerden Mc Farland No. 0.5 bulanıklık serisine göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

3.3.1.2. Kullanılan Antibiyotikler

Kullanılan antibiyotik disklerine ait bilgiler ve CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) verilerine göre Enterokok bakterilerinin antibiyotik direnç profili bilgileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: CLSI verilerine göre direnç profili.

Antibiyotik ($\mu\text{g/ml}$)	Zon çapı (mm)		
	Du	Yd	Di
Nalidiksik asid; NA(30)	≥ 19	14-18	≤ 13
Streptomisin; S(10)	≥ 10	-	≤ 6
Penisilin; P(10)	≥ 15	-	≤ 14
Kloramfenikol; C(30)	≥ 18	13-17	≤ 12
Vankomisin; VA(10)	≥ 17	15-16	≤ 14
Tetrasiklin; TE(30)	≥ 19	15-18	≤ 14
Siprofloksasin; CIP(5)	≥ 21	16-20	≤ 15
Kanamisin; K(30)	≥ 18	15-17	≤ 14
Amikasin; AM(30)	≥ 17	15-16	≤ 14
Ampisilin; AM(10)	≥ 17	-	≤ 16
Eritromisin; E(15)	≥ 23	14-22	≤ 13
Gentamisin; CN(10)	≥ 15	13-14	≤ 13
Rifampisin; RIF(5)	≥ 20	17-19	≤ 16

Du: Duyarlı, Yd: Yarı-duyarlı, Di: Dirençli.

3.3.1.3. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Enterokok bakterilerinin antibiyotiklere karşı duyarlılık/dirençlilik profilleri, Kirby-Bauer Antibiyotik Disk Difüzyon yöntemi ile incelenmiş ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre belirlenmiştir (CLSI, 2016). Bulanıklık serisine göre ayarlanan örneklerden 100 μl alınarak Mueller Hinton Agar (MHA) (Oxoid, UK) besiyerine yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri, bakteri süspansiyonlarının besiyerine iyice nüfuz etmesi için 5-10 dakika oda ısısında bekletilmiş, daha sonra her bir Petri kutusunda 3 adet olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Tüm Petri kutuları 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda meydana gelen zon çapları milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek ortalamaları alınmıştır. Ortalama inhibisyon zon çapları CLSI verileri (Tablo 3.1) dikkate alınarak “duyarlı”, “yarı-duyarlı”, “dirençli” olacak şekilde belirlenmiştir.

Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmış ve tüm deney prosedürü aynı şekilde uygulanmıştır. Deneyler her bir bakteri için 2 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

3.3.2. Hemoliz Aktivitesinin İncelenmesi

Enterokok suşlarının hemoliz aktivitesi, 37 °C’de 18 saat TSA besiyerinde üreyen taze kültürlerden, %5 oranında koyun kanı içeren Columbia Agar besiyerine çizgi ekim yapılarak incelenmiştir. Petri kutuları 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda kolonilerin etrafında gelişen zonlar gözlemlenmiştir. İnkübasyondan sonra, kolonilerin etrafında, parlak-yeşil zon oluşturan koloniler α -hemolitik, berrak zon oluşturanlar β -hemolitik, zon oluşturmayanlar ise γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir. Deney, her bir

bakteri için 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hemoliz aktivitesinin değerlendirilmesi için pozitif kontrol olarak, α - hemolitik aktiviteye sahip *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, β -hemolitik aktiviteye sahip *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve γ -hemolitik aktiviteye sahip *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır (Valenzuela ve diğ., 2009).

3.3.3. Jelatinaz Aktivitesinin İncelenmesi

Deniz suyundan izole edilerek Bile Esculin Agar Besiyeri'nde üreme aktivitesi doğrulanmış 66 örneğin jelatinaz aktivitesi Dahlén ve diğ. (2011)'nin kullandığı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan suşlar Mc Farland No. 1 bulanıklık serisine göre ayarlanmış ve her bir bakteri süspansiyonundan 100 μ l alınarak %4 jelatin içeren Beyin Kalp İnfüzyon Broth (Merck, Germany) besiyeri içeren tüplere ekilmiş ve bu tüpler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüplerde sıvılaşma olup olmadığı incelenmiş ve tüpler +4 °C'e kaldırılarak 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda besiyerinde sıvılaşmanın devam ettiği tüplerdeki reaksiyon, jelatinaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Besiyerinde sıvılaşma meydana gelmeyen tüpler ise jelatinaz reaksiyonu negatif olarak kabul edilmiştir. Jelatinaz aktivitesinin değerlendirilmesi için pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır.

3.3.4. Kazeinaz Aktivitesinin İncelenmesi

Kazeinaz aktivitesi testi için, deniz suyundan izole edilerek Bile Esculin Agar Besiyeri'nde siyah halo ile çevrelenmiş ve üreme aktivitesi doğrulanmış örnekler, Mc Farland No. 1 bulanıklık serisine göre ayarlanmış ve her bir bakteri süspansiyonundan 10 μ l alınarak, %3 Skim-milk Powder içeren Mueller Hinton Agar (Oxoid, UK) besiyerlerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiştir. Tüm Petri kutuları 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, MHA Besiyerinde kolonilerin etrafındaki şeffaf zonların varlığı kazeinaz aktivitesi pozitif, herhangi bir zon olmayan örnekler ise kazeinaz aktivitesi negatif olarak değerlendirilmiştir. Kontrol suşları olarak kazeinaz aktivitesi gösteren *Bacillus subtilis* ve kazeinaz aktivitesi göstermeyen *Escherichia coli* bakterileri kullanılmıştır (Kazanas, 1967).

3.3.5. Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin İncelenmesi

Deniz suyundan izole edilen Enterokok cinsi bakterilerin biyofilm oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi amacıyla, Triptik Soy Agar (TSA) (Merck, Germany) besiyerine ekim

yapılmış ve örnekler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, besiyerinde üreyen kolonilerden alınarak Triptik Soy Broth (TSB) (Merck, Germany) besiyerinde, Mc Farland 0.5 no’lu bulanıklık serisine göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonlarından 100’er µl alınarak steril şartlar altında, 96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril polistren mikropleytlere inokule edilmiştir. Mikropleytler 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuk, 100 µl PBS ile 2’şer kez yıkandıktan sonra yüzeye tutunmayan bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Her bir kuyucuğa %1’lik kristal viyole boyası eklenmiş ve 15 dakika beklenmiştir. Süre sonunda kuyucuklara tutunan bakteriler kristal viyole boyası ile boyanırken, bakteri örneği içermeyen mikropleyt yüzeyi boyanmadan kalmaktadır. Kuyucuklardaki fazla kristal viyole boyasından arındırmak için her bir kuyucuk, steril çeşme suyu ile 3 kez yıkanmıştır. Mikropleytler 37 °C’lik etüvde 30 dakika boyunca kurumaya bırakılmıştır. Süre sonunda, her bir kuyucuğa % 95’lik etanolden 200 µl eklenmiş ve hücrelerin içindeki boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Mikropleytlerde çözülmüş halde bulunan Etil Alkol-Kristal Viyole boyası çözeltisi ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) okuyucusunda (Thermo Scientific) 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (Şekil 3.3) (Friedman ve Kolter, 2004).

Deney, her bir bakteri için 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşturma kapasitesinin değerlendirilmesi için pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212, negatif kontrol olarak ise steril çeşme suyu kullanılmıştır. Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasitesinin değerlendirilmesinde Stepanovic ve diğ. (2000) tarafından tanımlanan aşağıdaki kriterler esas alınmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin değerlendirilmesi.

Biyofilm Oluşturma Kapasitesi	Absorbans Aralığı
Tutunmanın olmadığı	$OD \leq OD_c$
Zayıf tutunma kapasitesi	$OD_c < OD \leq 2x OD_c$
Orta kuvvette tutunma kapasitesi	$2x OD_c < OD \leq 4x OD_c$
Kuvvetli tutunma kapasitesi	$4x OD_c < OD$

OD: Optik dansite.

Tablo 3.2’de belirtilen değerlerden OD_c değeri, 540 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerinin ortalamaları ile standart sapma değerlerinin toplanması sonucu elde edilen değeri gösterirken, OD ise Enterokok bakterilerini içeren kuyucuklardan elde edilen boyanın absorbans değerini belirtmektedir (Stepanovic ve diğ., 2000).

3.3.6. Serum Duyarlılıklarının İncelenmesi

3.3.6.1. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

İnsan serumunun, Enterokok bakterilerine karşı gösterdiği bakterisidal etkinin test edilmesi için, TSA besiyerinde üreyen 24 saatlik taze kültürlerden Mc Farland 0.5 no'lu bulanıklık serisine göre süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak Beyin Kalp İnfüzyon Agar (Merck, Germany) besiyerine inokule edilmiş ve 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir örnek, 5 ml Triptik Soy Broth (TSB) (Merck, Germany) besiyeri içerisinde 10⁵ h/ml olacak şekilde süspanse edilmiştir. Örnekler, 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant dökülmüştür. Altta kalan pelet, tekrar 5 ml PBS içerisinde 10⁵ h/ml olacak şekilde tekrar süspanse edilmiş ve 600 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür (Joiner ve diğ., 1986).

3.3.6.2. İnsan Serumunun Hazırlanması

Antibiyotik kullanmayan sağlıklı bireylerden alınan kan santrifüj tüplerine boşaltılmış ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda ayrılan serum örnekleri, steril şartlar altında 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine eşit miktarlarda paylaştırılarak kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.3.6.3. Serum Duyarlılık Deneyleri

Hazırlanan 100 µl bakteri süspansiyonu ve 100 µl serum 96 kuyucuklu mikropleytlere eklenmiştir. Tüm mikropleytler 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her bir örnek için, 0, 60, 120 ve 180. dakikada mikropleyt kuyucuklarından 50 µl alınarak Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiştir. Tüm Petri kutuları 37 °C'de 24 inkübasyona bırakılmıştır.

Serum direnci aktivitesinin değerlendirilmesinde, pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmış ve negatif kontrol olarak serum içermeyen bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. Deney, her bir bakteri için 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerinde gelişen koloniler sayılarak bakterilerin serum duyarlılıkları incelenmiş ve 180. dakika sonrasında, besiyerinde üreyen koloni sayısı 0. saate göre %1 ve altı oranında azalmışsa seruma duyarlı, %90'ın üzerine çıkmışsa seruma dirençli, %1-90 arasında ise seruma yarı duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.3) (Benge, 1988).

Tablo 3.3: Enterokok suşlarının serum duyarlılıklarının değerlendirilmesi.

Serum Direnci Aktivitesi	kob/ml (0. saate göre)
Du	(kob/ml)-% 1
Yd	% 1 < (kob/ml) < % 90
Di	> % 90

kob: Koloni oluşturan birim, **Du:** Seruma duyarlı, **Yd:** Seruma yarı-duyarlı, **Di:** Seruma dirençli.

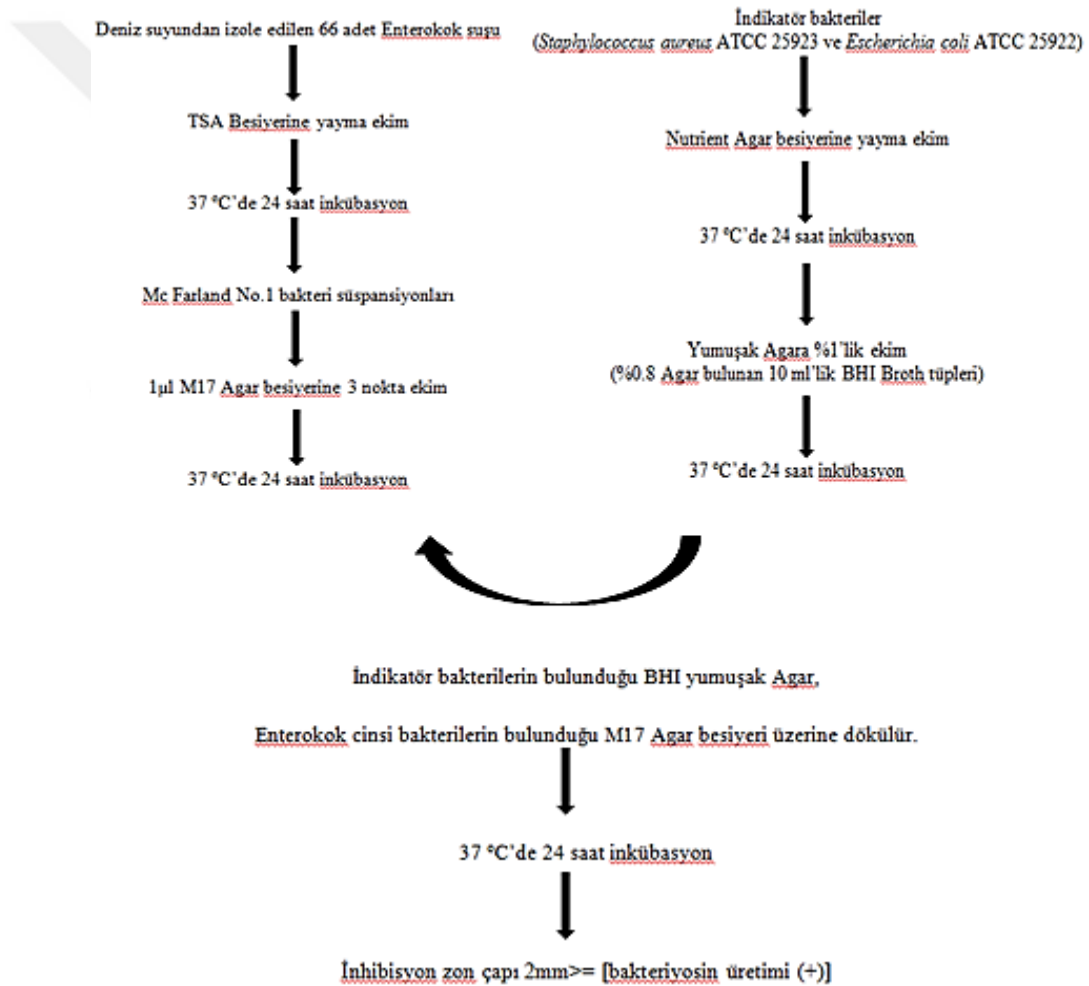
3.3.7. Hemaglutinasyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Deniz suyu örneklerinden izole edilen Enterokok suşlarının hemaglutinasyon aktivitelerini belirlemek amacıyla Davis ve diğ. (1982) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Deniz suyundan izole edilen ve Bile Esculin Agar Besiyerinde koloni morfolojisi doğrulanan örnekler, McFarland No. 0.5 bulanıklık serisine göre hazırlanmıştır. Bulanıklık serisine göre hazırlanan Enterokok suşlarından 100 µl alınarak 10 ml Todd Hewitt Broth (THB) (Sigma, US) besiyeri içersine inokule edilmiş ve 37 °C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kültürler 0.25 mg/10 ml tripsin ile 37 °C’de 1 saat muamele edilmiştir. Hemaglutinasyon testi için, 100 µl %3’lük insan eritrositi ile 100 µl tripsin-muamelesi yapılmış Enterokok suşları, steril bir lam üzerinde 10 dakika dairesel hareketlerle çalkalanarak karışması sağlanmıştır. Hemaglutinasyon aktivitesi, lam üzerindeki karışımın 2 dk içerisinde insan kanı alyuvarlarında çökelme oluşturması kuvvetli (++++), ilk 10 dk içerisinde çökelme oluşturması orta kuvvette (+++), 10 dk sonunda çökelme oluşturması zayıf (++) ve 10 dk sonunda x4 büyütmede tespit edilebilen çökelme ise çok zayıf hemaglutinasyon aktivitesi (+) olarak değerlendirilmiştir (Gülhan ve diğ., 2005).

3.3.8. Enterokok Suşlarının Bakteriyosin Üretimi Aktivitesinin İncelenmesi

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun bakteriyosin üretimi aktivitesinin incelenmesinde, Agar-Sandviç yöntemi (Mary-Harting ve diğ., 1972) modifiye edilerek kullanılmıştır. İndikatör olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 standart bakterileri kullanılmıştır. Bunun için öncelikle, Enterokok suşları TSA Besiyerine ekilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik taze Enterokok kültürlerinden Mc Farland No.1’e göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir örnekten 1 µl alınarak M17 Agar Besiyeri plaklarının üzerine 3 nokta ekim yapılmış ve tüm Petri kutuları 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İndikatör bakteriler, Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerine ekildikten sonra 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyerinde üreyen, indikatör bakteri kolonilerden alınarak Mc Farland No.1’e göre bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve içersinde %0.8 Agar bulunan 10 ml’lik BHI Broth

tüplerine %1'lik olacak şekilde ekim yapılmıştır. Böylece indikatör bakterilerinin bulunduğu BHI yumuşak agar hazırlanmıştır. İndikatör bakterileri içeren bu karışım 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, Enterokok bakterilerinin bulunduğu M17 Agar plaklarının üzerine dökülmüştür. Enterokok suşları ve indikatör bakterileri içeren tüm Petri kutuları, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, Enterokok suşlarının indikatör bakteriler üzerinde oluşturduğu antimikrobiyal aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla besiyerinde oluşan zon çapları ölçülmüş ve 2 mm'den daha büyük zon çapı oluşturanlar bakteriyosin üretim etkinliği açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Xiraphi ve diğ, 2008) (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Enterokok cinsi bakterilerin bakteriyosin üretim aktivite şeması.

3.4. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN GENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ

3.4.1. Kromozomal DNA İzolasyonu

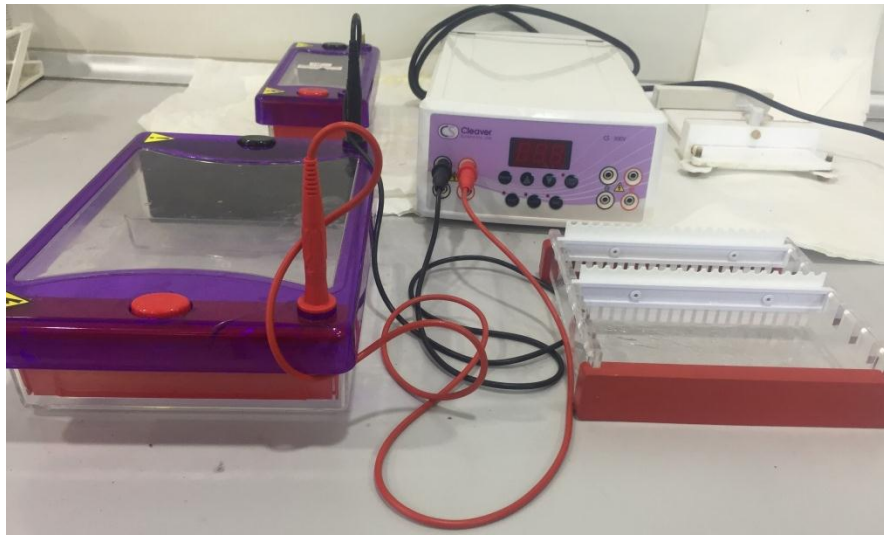
Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının kromozomal DNA izolasyonu IDPURE™ Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit (IDLabs™, Canada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, Gram pozitif kok, katalaz negatif, Bile Esculin Agar Besiyerinde koloni morfolojisi doğrulanmış ve API®20 Strep kiti ile tür tayini yapılmış 66 Enterokok suşu Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerine ekilmiş ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda, ticari firmanın talimatları doğrultusunda her bir örnek, steril şartlar altında 2×10^9 h/ml yoğunlukta olacak şekilde 2 ml’lik steril Eppendorf tüplere yerleştirilmiş ve 10000 g’de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatant atılmış ve her bir Eppendorf tüpüne 180 µl Lizozim solüsyonu eklenmiştir. Tüm örnekler 37 °C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir Eppendorf tüpü, salınım hareketiyle karıştırılmış ve RNA içermeyen örnek eldesi için 20 µl RNase A (10 mg/ml) eklenmiştir. Tüm örnekler, oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir Eppendorf tüpüne, kit içeriğinde bulunan 200 µl CL Buffer ve 20 µl Proteinaz K eklenerek salınım hareketiyle homojenize edilmiş ve 56 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüm Eppendorf tüplerine 200 µl %96’lık etanol eklenmiştir. Eppendorf tüpleri içerisindeki karışım, Spin Column yerleştirilmiş 2 ml’lik toplama tüpüne alınmıştır. Tüm örnekler, 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. Spin Column içerisine, kit içeriğinde bulunan 500 µl CW1 solüsyonu eklenmiş ve 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda, toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. Her bir örnek üzerine 500 µl CW2 solüsyonu eklenmiş ve 12000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda, Spin Column yerleştirilmiş toplama tüpü, hiçbir madde eklenmeksizin 12000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. Her bir örneğe ait Spin Column, steril 1.5 ml’lik Eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir. Spin Column membranı, içeriğindeki etanolün uzaklaşması için oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilmiştir. Son aşama olarak, Spin Column membranının tam orta noktasına, kit içeriğinde bulunan ve önceden 60 °C sıcaklıkta bekletilmiş CE Buffer’dan 75 µl eklenmiş ve tüm örnekler oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 12000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarına ait

kromozomal DNA örnekleri, farklı virulans gen bölgelerini belirlemede kullanılacak olan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi uygulanıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.4.1.1. Kromozomal DNA’nın Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Görüntülenmesi

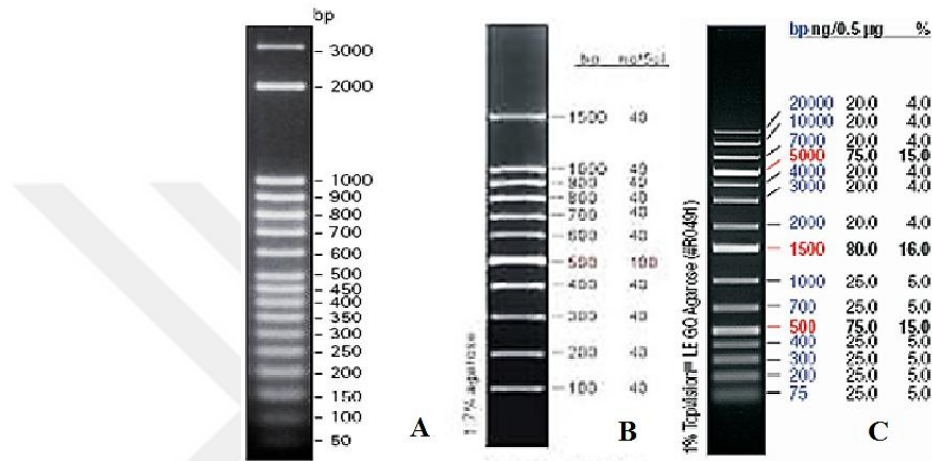
Saflaştırılmış DNA örneklerinin miktarı nicel olarak temiz semikuvarz küvetler içinde 260 nm ve 280 nm dalga boyunda Nanodrop cihazında (Thermo Scientific) absorbansları ölçülerek kaydedilmiştir.

-20 °C’de saklanan Enterokok suşuna ait kromozomal DNA örneklerinin nitel olarak analizi yatay agaroz jel elektrofrezisi (Clever Scientific) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Bunun için öncelikle %1’lik agaroz hazırlanmıştır. 250 ml Balon Joje içine 1.7 g agaroz tartılarak eklenmiş ve üzerine, önceden hazırlanan steril 1xTAE’den 170 ml eklenerek mikrodalgada agarozun kaynamamasına dikkat edilerek erimesi sağlanmıştır. Mikrodalgada eridikten ve homojenize olduktan sonra şeffaf bir hale gelen agaroz ve 1xTAE karışımı içine DNA bantlarının görüntülenmesi amacıyla 2.5 µl GelRed (Nükleikasit jel boyası, Biotium), nitril eldiven kullanılarak eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra karışım, tarakların yerleştirildiği ve kenarlarına kauçuk yapılar geçirilmiş olan 40 kuyucuklu agaroz tankına dökülerek, agaroz jelin donması için yaklaşık 15 dakika beklenmiştir. Jel donduktan sonra, jel tankındaki kauçuk ve taraklarından ayrılarak içerisinde yaklaşık 500 ml 1xTAE bulunan elektrofrez tankına dikkatli bir şekilde yerleştirilmiştir. Agarozun üzerini örtecek kadar 1xTAE ilave edilmiştir.



Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan yatay agaroz jel elektrofrezisi (Clever, Scientific).

Kesilen ince bir parafilm üzerinde yatay agaroz jel elektroforez tankına yüklenecek olan örnekler (1/10 oranında ultra saf su ile sulandırılmış 9µl DNA Marker [1 kb plus DNA Marker (Thermo Scientific™, Generuler)/ 100 bp DNA Marker (Biomatik, Canada)/ 50 bp DNA Marker (Sigma, US)] (Şekil 3.4) + 1 µl 6x Loading Dye (Biomatik, Canada) karışımı, 5 µl Enterokok kromozomal DNA) kuyucuklara dikkatlice yüklenmiştir. Çalışmada kullanılan markerlar Şekil 3.4’te gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Çalışmada kullanılan DNA Markerlar. **A:** 50 bp DNA Ladder (Sigma), **B:** 100 bp DNA Ladder (Biomatik), **C:** 1 kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific™, Generuler).

Her bir agaroz jel tankında, pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşuna ait kromozomal DNA, negatif kontrol olarak ise steril distile su kullanılmıştır. Elektroforez tankının kapağı dikkatlice kapatılarak elektrot yerleşimi siyah – uçtan, kırmızı + uca doğru olmak üzere, her bir örnek 110 V’da 60 dakika karanlık ortamda yürütülmüştür. Elektroforez tankında kabarcıkların gözlemlenmesi, elektrotlardan akımın iletilebildiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Süre sonunda sistem kapatılarak, agaroz jel, jel tankından alınmış, vakit kaybetmeden DNA bantları, kameralı jel görüntüleme sistemi (Daihan, Wisedoc) ile gözlemlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Çalışmada kullanılan kameralı jel görüntüleme sistemi (Daihan, Wisedoc).

3.4.2. Plazmit DNA İzolasyonu

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşuna ait plazmit izolasyonu, SpinKlean Plasmid DNA Miniprep Kit (Biomatik, Canada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, Gram pozitif kok, katalaz negatif, Bile Esculin Agar Besiyerinde koloni morfolojisi doğrulanmış ve API®20 Strep kiti ile identifikasyonu yapılmış 66 Enterokok suşu Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyerinde üreyen kolonilerden Mc Farland No.1'e göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Belirtilen yoğunluktaki bakteri örneklerinden 2 ml alınarak 10000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süre sonunda Eppendorf tüpünde kalan süpernatant atılmıştır. Geriye kalan pellet üzerine, kit içeriğindeki Resüspansiyon Solüsyonu'ndan 250 µl eklenmiş ve vortekslenerek süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon, steril şartlar altında 1.5 ml'lik Eppendorf tüplerine aktarılmış ve sonrasında üzerine kit içeriğinde bulunan Lizis Solüsyonu'ndan 250 µl eklenmiştir. Karışım, solüsyonun rengi açılana ve viskosite görülene dek 4-6 kez karıştırılmıştır; fakat kromozomal DNA'nın karışmaması için vortekslenmemiştir. Tüm örnekler üzerine, kit içeriğinde bulunan Nötralizasyon Solüsyonu'ndan 350 µl eklenmiş ve 4-6 kez salınım hareketiyle karıştırılmıştır. Karışım 14000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda süpernatant, kit içeriğindeki Spin Column'a boşaltılmış ve beyaz çökeltiden örnek alınmasından kaçınılmıştır. Karışım 14000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda toplama tüpünde kalan sıvı kısım atılmış ve kit içeriğinde bulunan Yıkama Solüsyonu PB'den 500 µl eklenmiştir. Tüm örnekler, 14000 g'de 30-60 saniye santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken süpernatant atılmıştır. Spin Column'a, kit içeriğinde

bulunan Yıkama Solüsyonu W'den 500 µl eklenmiş, tüm örnekler 14000 g'de 30-60 saniye tekrar santrifüj edilerek toplama tüpünde biriken süpernatant atılmış ve bu işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Tüm bu işlemler sonucunda Spin Column, 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne yerleştirilmiş ve Spin Column membranının tam orta noktasına, kit içeriğinde bulunan ve önceden 60 °C sıcaklıkta bekletilmiş Elution Buffer'dan 40 µl eklenmiştir. Tüm örnekler, oda sıcaklığında 2 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 14.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Enterokok suşlarına ait plazmit örnekleri, incelemede kullanılıncaya kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

3.4.2.1. Plazmit DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

SpinKlean Plasmid DNA Miniprep Kit (Biomatik, Canada) kullanılarak izolasyonu gerçekleştirilen Enterokok suşlarına ait plazmit DNA bant büyüklüklerini gözlemlemek için yatay agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Kesilen ince bir parafilm üzerinde yatay agaroz jel elektroforezi tankına yüklenecek örnekler [(1/10 oranında ultra saf su ile sulandırılmış 9µl λ DNA Marker (ThermoScientific™, Generuler) + 1 µl 6x Loading Dye (Biomatik, Canada) karışımı, 5 µl Enterokok plazmit DNA)] kuyucuklara dikkatlice yüklenmiştir. Her bir agaroz jel tankında, pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 standart suşu, negatif kontrol olarak ise ultra saf su kullanılmıştır. Elektroforez tankının kapağı dikkatlice kapatılarak elektrot yerleşimi siyah – uçtan, kırmızı + uca doğru olmak üzere, her bir örnek 110 V'da 60 dakika karanlık ortamda yürütülmüştür.

3.4.2.2. Plazmit Profil Büyüklüklerinin Belirlenmesi

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarına ait plazmit DNA büyüklüklerinin belirlenmesinde, moleküler büyüklükleri bilinen λ DNA Markerların (ThermoScientific™, Generuler) yatay agaroz jel elektroforezindeki hareketlilikleri ile belirtilen suşlara ait plazmit DNA büyüklüklerinin logaritmaları arasındaki ilişkiyi faydalanılmıştır (Macrina ve diğ., 1978; Southern, 1979; Schafer ve Sederof, 1981; Yüksel, 2012). Marker olarak kullanılan λ DNA yapısının yatay agaroz jel üzerindeki göç hareketlerinin UV translüminatörde görüntüleri alınarak, standart büyüklüklerinin logaritmasına bağlı kalınarak eğrileri çıkartılmıştır. Aşağıda belirtilen formül temel alınarak, her bir örnek için korelasyon katsayısı ve eğrinin eğimi belirlenerek Enterokok suşlarından izole edilen plazmit DNA'larının büyüklükleri saptanmaya çalışılmıştır (Campbell, 1974; Elder ve Southern 1983; Elder ve diğ., 1983; Yüksel, 2012).

$$\text{Eğrinin Eğimi (I)} = \frac{E - (G \cdot C)}{B - (G \cdot A)}$$

$$\text{Korelasyon katsayısı (J)} = \frac{E - (G \cdot C)}{\sqrt{[D - (H \cdot C)] \cdot [B - (G \cdot A)]}}$$

$$\text{Moleküler Büyüklük(W)} = \text{Antilog}_{10}[I \cdot (\alpha - G) + H]$$

X = Marker DNA moleküllerinin agaroz jel üzerindeki göç aralığı (mm)

Y = Marker DNA moleküllerinin büyüklüğü (kb)

$$A = X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n$$

$$B = X_1^2 + X_2^2 + X_3^2 + \dots + X_n^2$$

$$C = \log_{10} Y_1 + \log_{10} Y_2 + \log_{10} Y_3 + \dots + \log_{10} Y_n$$

$$D = (\log_{10} Y_1)^2 + (\log_{10} Y_2)^2 + (\log_{10} Y_3)^2 + \dots + (\log_{10} Y_n)^2$$

$$E = X_1 (\log_{10} Y_1) + X_2 (\log_{10} Y_2) + X_3 (\log_{10} Y_3) + \dots + X_n (\log_{10} Y_n)$$

$$G = \text{Ortalama X} = A/N$$

$$H = \text{Ortalama Y} = C/N$$

α = Moleküler büyüklüğü bilinmeyen plazmitin jel üzerindeki göçü (mm) (Yüksel, 2012).

3.4.3. Virulans Faktörlerinin Genotipik Olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile İncelenmesi

Deniz suyundan izole edilen ve kromozomal ve plazmit DNA izolasyonu yapılan 66 Enterokok suşunda antibiyotik direnç genlerini ve virulans genlerini tespit etmek için PZR yöntemi uygulanmıştır.

3.4.3.1. Antibiyotik Direnç ve Virulans Genlerini Tespit Etmek için Kullanılan

Primerler

IDPURE™ Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit (IDLabs™, Canada) ile kromozomal ve plazmit DNA izolasyonu yapılmış tüm Enterokok suşlarının antibiyotik direnç genlerinin (*vanA*, *vanB*, *ant(6)-la*, *acc(6')-aph(2'')*, *aphA-3*, *rpoB1*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *ermB*, *catpIP*, *tetM* ve *tetL*) ve virulans genlerinin (*ace*, *gelE*, *agg*, *esp*, *fsr*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *cob*, *ccf* ve *hyn*) incelenmesi için klasik PZR yöntemi uygulanmıştır. PZR yönteminde antibiyotik direnç ve virulans genlerini tespit etmek için kullanılan primerler Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerini tespit etmek için kullanılan primerler.

Antibiyotik Direnç Geni	Primer Dizisi	Bant Büyüklüğü (bp)	Antibiyotik Adı	Referans
<i>vanA</i>	(F) 5' GGGAAAACGACAATTGC 3' (R) 3' GTACAATGCGGCCGTTA 5'	732	Vankomisin	Poeta ve diğ., 2005
<i>vanB</i>	(F) 5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3' (R) 3' GATTCGTTCCCTCGACC 5'	635	Vankomisin	Mcgregor ve Young, 2000
<i>ant(6)-la</i>	(F) 5' ACTGGCTTAATCAATTTGGG 3' (R) 3' GCCTTCCGCCACCTCACCG 5'	577	Streptomisin	Poeta ve diğ., 2005
<i>acc(6')-aph(2'')</i>	(F) 5' CCAAGAGCAATAAGGGCATAACC 3' (R) 3' ACCCTCAAAAACCTGTTGTTGC 5'	675	Gentamisin	Kobayashi ve diğ., 2001
<i>aphA-3</i>	(F) 5' GCCGATGTGGATTGCGAAAA 3' (R) 3' GCTTGATCCCCAGTAAGTCA 5'	292	Kanamisin	Braak ve diğ., 1999
<i>rpoB1</i>	(F) 5' GTCCGTTTCGGCTTTAATATA 3' (R) 3' AAGAAACGAGCATTTCAGCAA 5'	1000	Rifampisin	Enne ve diğ., 2004
<i>rpoB2</i>	(F) 5' CGCAAGCGACTCAAGAACAG 3' (R) 3' GAGCAAATGTTCCATCTTCA 5'	1000	Rifampisin	Enne ve diğ., 2004
<i>bla(Z)</i>	(F) 5' TACAACGTAAATATCGGAGGG 3' (R) 3' CAATAGGTTTCAGATTGGCCC 5'	778	Ampisilin	Stovcik ve diğ., 2008
<i>ermB</i>	(F) 5' CATTTAACGACGAAACTGGC 3' (R) 3' GGAACATCTGTGGTATGGCG 5'	422	Eritromisin	Aarestrup ve diğ., 2000
<i>catpIP</i>	(F) 5' GGATATGAAATTTATCCCTC 3' (R) 3' CAATCATCTACCCTATGAAT 5'	486	Kloramfenikol	Aarestrup ve diğ., 2000
<i>tetM</i>	(F) 5' GTTAAATAGTGTCTTGGAG 3' (R) 3' CTAAGATATGGCTCTAACAA 5'	657	Tetrasiklin	Aarestrup ve diğ., 2000
<i>tetL</i>	(F) 5' CATTTGGTCTTATTGGATCG 3' (R) 3' ATTACACTCCGATTTCGG 5'	475	Tetrasiklin	Aarestrup ve diğ., 2000

(F): Forward primer, (R): Reverse primer.

Tablo 3.5: Enterokok suşlarında virulans genlerini tespit etmek için kullanılan primerler.

Virulans Geni	Primer Dizisi	Bant Büyüklüğü (bp)	Görevi	Referans
<i>ace</i>	(F) 5' AAAGTAGAATTAGATCCACAC 3' (R) 3' TCTATCACATTCCGGTTGCG 5'	320	Hücre dışı matriks proteinlerine bağlanma	Mannu ve diğ., 2003
<i>gel E</i>	(F) 5' AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC 3' (R) 3' CTTTATTATTTACACGTTTG 5'	402	Jelatinaz	Mannu ve diğ., 2003
<i>agg</i>	(F) 5' AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC 3' (R) 3' AAACGGCAAGACAAGTAAATA 5'	1553	Agregasyon faktörü	Eaton ve Gasson, 2001
<i>esp</i>	(F) 5' TTGCTAATGCTAGTCCACGACC 3' (R) 3' GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA 5'	955	Yüzey proteini	Eaton ve Gasson, 2001
<i>fsr</i>	(F) 5' AACCAGAATCGACCAATGAAT 3' (R) 3' GCCCTCATAACTCAATACC 5'	3268	Jelatinaz ve serin proteazın ifadesini düzenler.	Pillai ve diğ., 2002
<i>cylM</i>	(F) 5' CTGATGGAAAGAAGATAGTAT 3' (R) 3' TGAGTTGGTCTGATTACATTT 5'	742	Sitolizin	Eaton ve Gasson, 2001
<i>cylB</i>	(F) 5' ATTCCTACCTATGTTCTGTTA 3' (R) 3' AATAAACTCTTCTTTTCCAAC 5'	843	Sitolizin	Eaton ve Gasson, 2001
<i>cylA</i>	(F) 5' TGGATGATAGTGATAGGAAGT 3' (R) 3' TCTACAGTAAATCTTTCGTCA 5'	517	Sitolizin	Eaton ve Gasson, 2001
<i>efaAfs</i>	(F) 5' GACAGACCCTCACGAATA 3' (R) 3' AGTTCATCATGCTGTAGTA 5'	705	<i>E.faecalis</i> adezyon proteini	Eaton ve Gasson, 2001
<i>efaAfm</i>	(F) 5' AACAGATCCGCATGAATA 3' (R) 3' CATTTTCATCATCTGATAGTA 5'	735	Enterokok adezyon proteini	Eaton ve Gasson, 2001
<i>cpd</i>	(F) 5' TGTTGGGTTATTTTTCAATTC 3' (R) 3' TACGGCTCTGGCTTACTA 5'	782	Seks feromonu	Eaton ve Gasson, 2001
<i>cob</i>	(F) 5' AACATTCAGCAAACAAAGC 3' (R) 3' TTGTCATAAAGAGTGGTCAT 5'	1405	Seks feromonu	Eaton ve Gasson, 2001
<i>ccf</i>	(F) 5' GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG 3' (R) 3' AGCCGCTAAAATCGGTAATAAT 5'	543	Seks feromonu	Eaton ve Gasson, 2001

(F): Forward primer, (R): Reverse primer.

3.4.3.2. PZR Yöntemi

Enterokok bakterilerinde antibiyotik direnç ve virulans genlerini tespit etmek için kullanılan PZR yönteminde hazırlanan karışıma ait bilgiler Tablo 3.6'da belirtilmiştir.

Tablo 3.6: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç ve virulans genlerini tespit etmek için hazırlanan PZR karışımı.

PZR Yöntemi'nde Kullanılan Karışım	Hacim
Taq PCR Master Mix (2x, Biomatik)	25 µl
Enterokok DNA	5 µl
Forward Primer	1 µl (10 µM)
Reverse Primer	1 µl (10 µM)
Steril distile su	18 µl

Tablo 3.6'da belirtilen karışım sırasıyla olmak koşuluyla, 0.2 ml'lik PZR tüplerine yerleştirilmiş ve vakit kaybedilmeden Thermal Cycler (Biorad T100) cihazına yerleştirilmiştir. Tüm antibiyotik direnç ve virulans genlerinin PZR yöntemi ile belirlenmesinde pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu ve negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılmıştır.

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının antibiyotik direnç ve virulans genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları Tablo 3.7 ve Tablo 3.8'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: *vanA*, *vanB*, *ant(6)-la*, *acc(6')-aph(2'')*, *aphA-3*, *rpoB1*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *ermB*, *catIP*, *tetM* ve *tetL* antibiyotik direnç genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

Antibiyotik Direnç Genleri	PZR Koşulları	Referans
<i>vanA</i> ve <i>vanB</i>	Başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 5 dakika Denatürasyon 94 °C'de 1 dakika Bağlanma T _m °C (54)'de 1 dakika Uzama 72 °C'de 1 dakika Son uzama 72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞	30 döngü Poeta ve diğ., 2005; Mcgregor ve Young, 2000
<i>ant(6)-la</i>	Başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 10 dakika Denatürasyon 94 °C'de 30 saniye Bağlanma T _m °C (54)'de 30 saniye Uzama 72 °C'de 30 saniye Son uzama 72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞	30 döngü Poeta ve diğ., 2005
<i>acc(6')-aph(2'')</i>	Başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 5 dakika Denatürasyon 94 °C'de 1 dakika Bağlanma T _m °C (58)'de 1 dakika Uzama 72 °C'de 2 dakika Son uzama 72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞	30 döngü Kobayashi ve diğ., 2001
<i>aphA-3</i>	Başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 5 dakika Denatürasyon 94 °C'de 30 saniye Bağlanma T _m °C (54.5)'de 30 saniye Uzama 72 °C'de 2 dakika Son uzama 72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞	32 döngü Braak ve diğ., 1999
<i>rpoB1</i> ve <i>rpoB2</i>	Başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 5 dakika Denatürasyon 95 °C'de 1 dakika Bağlanma T _m °C (57)'de 1 dakika Uzama 72 °C'de 1 dakika Son uzama 72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞	35 döngü Enne ve diğ., 2004

T_m: Bağlanma sıcaklığı.

Tablo 3.7 (devam): *vanA*, *vanB*, *ant(6)-Ia*, *acc(6')-aph(2'')*, *aphA-3*, *rpoB1*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *ermB*, *catpIP*, *tetM* ve *tetL* antibiyotik direnç genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

Antibiyotik Direnç Genleri	PZR Koşulları	Referans
<i>bla(Z)</i>	Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de 5 dakika
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	Tm °C (58)'de 30 saniye
	Uzama	72 °C'de 2 dakika
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞
	} 35 döngü	Stovcic ve diğ., 2008
<i>ermB</i>	Başlangıç denatürasyonu	93 °C'de 5 dakika
	Denatürasyon	93 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	Tm °C (56)'de 1 dakika
	Uzama	72 °C'de 1 dakika
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞
	} 35 döngü	Aarestrup ve diğ., 2000
<i>catpIP</i>	Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de 5 dakika
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	Tm °C (50)'de 1 dakika
	Uzama	72 °C'de 2.5 dakika
	Son uzama	72 °C'de 7 dakika +4 °C'de ∞
	} 30 döngü	Aarestrup ve diğ., 2000
<i>tetM</i> ve <i>tetL</i>	Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de 5 dakika
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	Tm °C (53.5)'de 30 saniye
	Uzama	72 °C'de 2 dakika
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞
	} 30 döngü	Aarestrup ve diğ., 2000

Tm: Bağlanma sıcaklığı.

Tablo 3.8: *ace*, *gelE*, *efaAfm*, *efaAfs*, *esp*, *agg*, *cylA*, *cylM*, *cylB*, *cpd*, *cob*, *ccf* ve *fsr* virulans genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

Virulans Genleri	PZR Koşulları		Referans		
<i>ace</i> ve <i>gelE</i>	Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de 5 dakika	} 30 döngü	Mannu ve diğ., 2003	
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika			
	Bağlanma	Tm °C'de 1 dakika			
	Uzama	72 °C'de 1 dakika			
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞			
		Tm _{ace} : 53 °C; Tm _{gelE} : 50 °C			
<i>efaAfm</i> , <i>efaAfs</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>cylA</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cpd</i> , <i>ccf</i> ve <i>cob</i>	Başlangıç denatürasyonu	94 °C'de 5 dakika	}	1 döngü	Eaton ve Gasson, 2001
	Denatürasyon	94 °C'de 2 dakika			
	Bağlanma	Tm °C'de 2 dakika	}	30 döngü	
	Uzama	72 °C'de 2 dakika			
	Denatürasyon	92 °C'de 15 saniye			
	Bağlanma	Tm °C'de 15 saniye			
	Uzama	72 °C'de 15 saniye			
Son uzama	72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞				
		Tm _{efaAfm} : 49 °C; Tm _{efaAfs} , Tm _{cob} , Tm _{cylB} : 50 °C; Tm _{agg} , Tm _{cylA} , Tm _{cylM} , Tm _{cpd} : 52 °C; Tm _{ccf} : 54 °C; Tm _{esp} : 60 °C			
<i>fsr</i>	Başlangıç denatürasyonu	95 °C'de 5 dakika	}	30 döngü	Pillai ve diğ., 2002
	Denatürasyon	94 °C'de 30 saniye			
	Bağlanma	Tm °C (55)'de 30 saniye			
	Uzama	72 °C'de 2.5 dakika			
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika +4 °C'de ∞			

Tm: Bağlanma sıcaklığı.

3.4.3.3. Antibiyotik Direnç ve Virulans Genlerinin Agaroz Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunda, antibiyotik direnç gen bölgeleri (*vanA*, *vanB*, *ant(6)-Ia*, *acc(6')-aph(2'')*, *aphA-3*, *rpoB1*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *ermB*, *catpIP*, *tetM* ve *tetL*) ve virulans gen bölgeleri (*ace*, *gelE*, *agg*, *esp*, *fsr*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *cob* ve *ccf*) PZR yöntemi ile çoğaltılmış ve oluşan DNA bantlarını görüntülemek için Bölüm 3.4.2'de belirtildiği gibi yatay agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. %1'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra 40 kuyucuklu yatay agaroz jel tankına dökülmüş ve donması için yaklaşık 15 dakika beklenmiştir. Kesilen ince bir parafilm üzerinde yatay agaroz jel elektrofrez tankındaki kuyucuklara örnekler [(1/10 oranında ultra saf su ile sulandırılmış 9µl 50 bp/100 bp DNA Marker (Biomatik, Canada) + 1 µl 6x Loading Dye (Biomatik, Canada) karışımı, 5 µl Enterokok antibiyotik direnç gen bölgeleri ya da virulans gen bölgelerine ait PZR ürünü + 1 µl 6x Loading Dye (Biomatik, Canada) karışımı] dikkatlice yüklenmiştir. Her bir agaroz jel tankında, pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun sahip olduğu antibiyotik direnç gen bölgeleri ya da virulans gen bölgelerine ait PZR ürünü, negatif kontrol olarak ise ultra saf su kullanılmıştır. Elektrofrez tankının kapağı dikkatlice kapatılarak elektrot yerleşimi siyah – uçtan, kırmızı + uca doğru olmak üzere, her bir örnek 110 V'da 60 dakika karanlık ortamda yürütülmüştür.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada kullanılan verilerin analizinde SPSS 22.0 istatistik programı kullanılmıştır. Çalışmadaki bağımsız 2 grup değişkenin normal dağılım değerleri Kolmogorov-Smirnov t Testi ile normal dağılım göstermeyenlerin ise Mann-Whitney U testi ile incelenmiştir. Çalışmada incelenen fenotipik ve genotipik deneyler gibi kategorik veriler, Person Chi-Square ve Fisher's Exact testleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada, 66 adet Enterokok suşundan sadece bir *E. gallinarum* suşu olduğu için istatistiksel analizde değerlendirilme dışı bırakılmıştır. Deneyde incelenen tüm veriler, n (sayı) ve yüzde (%) ile gösterilmiştir. Verilerin güven aralığı %95 olup, $p < 0.05$ değeri ise veriler arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir (Kılıç, 2015).

3.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.6.1. Bile Esculin Agar Besiyeri (Oxoid, UK)

Fekal kontaminasyon kaynağı olan D grubu Streptokok cinsi bakteriler ve özellikle Enterokok cinsi bakterilerin izolasyonunda ve tanımlanmasında kullanılmaktadır. Enterokoklar, eskulin hidrolizi aktivitesine sahip olmakla birlikte safra tuzlarına da dirençli olduklarından diğer pek çok refakatçi floranın gelişimini baskılamaktadır.

Enterokok cinsi bakteriler, eskulini, dekstrozu ve eskuletini hidroliz ederler. Eskuletin ise besiyeri içeriğinde bulunan demir (III) iyonları ile reaksiyona girerek besiyerinin rengini zeytin yeşili-kahverengi-siyaha dönüştürürler. Diğer yandan besiyeri içeriğindeki safra tuzu ve eskulin de, diğer pek çok mikroorganizmanın üremesini engellemektedir (Facklam, 1973).

Bile Esculin besiyeri içeriği;

Pepton	14.0 g
Safra tuzu	15.0 g
Ferrik sitrat	0.5 g
Eskulin	1.0 g
Agar	14.0 g

pH: 7.1±0.2

Dehidre besiyeri 44.5 g olacak şekilde tartılıp üzerine 1000 ml kaynar distile su eklenerek karıştırılmış ve homojenize edilmiştir. Karışım, otoklav cihazında 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiş ve 45°C'ye kadar soğuduktan sonra, steril şartlar altında disposable Petri kutularına 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaştıran besiyeri 37°C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir. +4 °C'de 3 haftaya kadar kullanılabilir.

3.6.2. Beyin Kalp İnfüzyon Agar Besiyeri (Merck, Germany)

Mikrobiyolojik analizlerde özellikle zor üreyen bakteriler için kullanılan genel katı besiyeridir. İçeriğinde klinik ve klinik olmayan materyallerden izole edilen bakterilerin kültüre edilmesinde kullanılmaktadır. İçeriğindeki beyin ve kalp infüzyonu, pepton ve glikozu, özellikle patojen mikroorganizmaların üremesinde etkindir. İçeriğindeki D(+) Glukoz ise, fermentatif mikroorganizmalar için karbonhidrat kaynağıdır. Besiyeri, disodyum fosfat ilavesiyle tamponlanarak kullanılmaktadır (Nash ve Krenz, 1991).

Besin katkısı 27.5 g

(beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar)

D(+) Glukoz 2.0 g

NaCl 5.0 g

Na₂HPO₄ 2.5 g

Agar 15.0 g

Distile su 1000 ml

pH: 7.4 ± 0.2

Hazırlanan besiyeri, otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiştir. 37°C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.3. Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri (Merck, Germany)

Mikrobiyolojik analizlerde özellikle zor üreyen bakteriler için kullanılan genel katı besiyeridir. Streptococci, *Neisseria* gibi mikroorganizmaların üremesi için zengin besiyeri ortamından oluşan genel amaçlı besiyerlerindedir (Rosenow, 1919).

Besin katkısı 27.5 g

(beyin ekstraktı, kalp ekstraktı ve peptonlar)

D(+) Glukoz 2.0 g

NaCl	5.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.4 ± 0.2

Hazırlanan besiyeri, otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiştir. Bir gece sterilizasyon kontrolünden sonra bulanıklık olmayan tüpler çalışmada kullanılmıştır.

3.6.4. %0.8'lik Agar Bulunan Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri

Enterokok suşlarının bakteriyosin aktivitesinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Beyin Kalp İnfüzyon Broth	37.0 g
Agar	8.0 g
Distile su	1000 ml

Karışım, otoklav cihazında 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.5. %4 Jelatin İçeren Beyin Kalp İnfüzyon Broth Besiyeri

Beyin Kalp İnfüzyon Broth	37.0 g
Jelatin	40.0 g
Distile su	1000 ml

Karışım, 16x160 mm'lik cam deney tüplerine 10 ml hacimde olacak şekilde dağıtılmış ve tüm tüpler, otoklav cihazında 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.6. Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri (Merck, Germany)

Su ve gıda mikrobiyolojisi örnekleri gibi pek çok çevresel örnekte kullanılmakla birlikte, zenginleştirilmemiş TSA Besiyeri, *Enterobacteriaceae*, Stafilokoklar, Enterokoklar, fermente

edici olmayan Gram negatif çomaklar, *Bacillus* cinsi gibi bakterilerin üretilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (MacFaddin, 1985).

Pepton (kazeinden)	15.0 g
Pepton (soya unu)	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.3±0.2

Hazırlanan besiyeri, otoklav cihazında 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiştir. 37 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.7. Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri (Merck, Germany)

İnhibitör veya indikatör içermeyen, genel amaçlı kullanılan sıvı besiyeridir, Enterokok cinsi bakterilerin üretilmesinde de kullanıma uygun olarak görülmektedir (Hawkey ve diğ., 1986).

Pepton (kazeinden)	17.0 g
Pepton (soya unu)	3.0 g
D(+) Glukoz	2.5 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.3±0.2

Karışım, eşit hacimlerde tüplere dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edildikten sonra berrak sarı renkte olan besiyeri kullanıma hazır

hale gelmiştir. Bir gece sterilizasyon kontrolünden sonra bulanıklık olmayan tüpler çalışmada kullanılmıştır.

3.6.8. Nutrient Agar Besiyeri (Oxoid, UK)

Mikroorganizmaların üremesi için genel kullanıma uygun olarak sıklıkla kullanılan katı besiyeridir (Lapage ve diğ., 1970).

Pepton	15.0 g
Maya özütü	3.0 g
NaCl	6.0 g
D(+) Glukoz	1.0 g
Agar	12.0 g

pH: 7.4±0.02

Hazırlanan besiyeri, otoklav cihazında 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiştir. 37°C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.9. Mueller-Hinton Agar (MHA) Besiyeri (Oxoid, UK)

Uluslararası kabul görmüş standart prosedürlerde antimikrobiyal duyarlılık testinde kullanılan genel katı besiyeridir (Mueller ve Hinton, 1941).

Çalışmamızda da deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi'ne göre antibiyotik duyarlılıklarını test etmek amacıyla kullanılmıştır.

Et özütü	3.0 g
Kazein hidrolizati	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Agar	17.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.3±0.1

Hazırlanan besiyeri, otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiştir. 37°C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.10. %3 Skim-milk Powder İçeren Mueller Hinton Agar (MHA) Besiyeri

Mueller Hinton Agar	38.0 g
Skim-milk powder	30.0 g
Distile su	1000 ml

Karışım, otoklav cihazında 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiş ve 45 °C'ye kadar soğuduktan sonra, steril şartlar altında disposable Petri kutularına 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaştıran besiyeri 37 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir. Hazırlanan besiyeri, çalışmada kazeinaz aktivitesinin test edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.6.11. %5 Koyun Kanlı Columbia Agar Besiyeri (Becton Dickinson, Germany)

Kanlı agar, çikolata agar ve çeşitli seçici besiyerlerinin hazırlanmasından temel olarak kullanılan besiyeridir. Kanlı Columbia Agar besiyeri, özellikle klinik örneklerden Gram pozitif bakterilerin izolasyonu için kullanılan seçici bir besiyeridir (Petts, 1984).

Çalışmamızda %5 koyun kanlı Columbia Agar Besiyeri, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının hemoliz aktivitesinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Kazein özü (pankreatik enzim)	12.0 g
Peptik özü (hayvan dokusundan)	5.0 g
Maya ekstraktı	3.0 g
Et ekstraktı	3.0 g
Mısır nişastası	1.0 g
NaCl	5.0 g

Agar	13.5 g
Distile su	1000 ml
Defibrine koyun kanı	%5

pH: 7.4±0.02

Karışım, otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiş ve 45°C'ye kadar soğuduktan sonra, steril şartlar altında %5 oranında hazırlanan eritrosit eklenmiş ve vakit kaybetmeksizin Petri kutularına yaklaşık 15 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Oda sıcaklığında katılaştıran besiyeri 37°C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir. Besiyeri +4°C'de 7 gün saklanabilmektedir (Petts, 1984).

3.6.12. M17 Agar Besiyeri (Himedia, India)

M17 Agar Besiyeri, laktik asit bakterlerinin, Streptokokların ve onların bakteriyofajlarının üremesi için kullanılan katı besiyeridir (Anderson ve Elliker, 1953).

Peptik özü (Hayvan dokusundan)	5.0 g
Papaik özü (soya küspesinden)	5.0 g
Maya özütü	2.5 g
Et özütü	5.0 g
Askorbik asit	0.5 g
Magnezyum sülfat	0.25 g
Laktoz	5.0 g
Agar	10.0 g
Disodyum β-Gliserofosfat	19.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.1±0.2

Karışım, eşit hacimlerde tüplere dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiş ve 45 °C'ye kadar soğuduktan sonra, steril şartlar altında disposable Petri kutularına 15'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Oda sıcaklığında katılaşılan besiyeri 37 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.13. Todd-Hewitt Broth (THB) Besiyeri (Sigma, US)

Todd-Hewitt Broth Besiyeri, A grubu hemolitik Streptokokların ve patojenik mikroorganizmaların üremesinde ve serolojik testlerde kullanılan sıvı besiyeridir (Todd ve Hewitt, 1932).

Sığır eti-kalp infüzyonu	500.0 g
Peptik özü (hayvan dokusu)	20.0 g
Dekstroz	2.0 g
NaCl	2.0 g
Disodyum fosfat	0.4 g
Sodyum karbonat	2.5 g
Distile su	1000 ml

Hazırlanan besiyeri, eşit hacimlerde tüplere dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiş ve 37 °C'de 24 saat bekletilerek sterilite kontrolü yapıldıktan sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.14. Çalışmada Kullanılan Eritrositlerin Eldesi

Eritrosit eldesi için sağlıklı bireyden alınan defibrine insan kanı ve defibrine koyun kanı vakit kaybetmeksizin 15 ml hacimli vida kapaklı plastik santrifüj tüplerine alınmıştır. Kanın diğer bileşenlerinden ayırmak ve saf eritrosit elde edebilmek için santrifüj tüpünün içindeki insan kanı, 800 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda, tüpün üstünde kalan sıvı atılmış ve dipte kalan eritrositler PBS ile baştaki hacmi ile eşit olacak şekilde sulandırılarak tekrar 800 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkama işlemi iki kez yapıldıktan sonra dipte kalan eritrosit süspansiyonu saf (%100'lük) eritrosit solüsyonu olarak değerlendirilmiştir.

3.6.15. Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS)

Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma ve hemaglutinasyon aktivitelerinin incelenmesinde, yıkama tamponu olarak kullanılmıştır.

NaCl	0.8 g
KCl	0.02 g
Na ₂ HPO ₄	0.29 g
KH ₂ PO ₄	0.02 g
Distile su	100 ml

pH: 7.2±0.02

Yukarıda belirtilen karışım, bir Erlen Mayer içerisinde hazırlanıp pH'sı ayarlandıktan sonra 121°C'de 1.2 atm basınç altında 15-30 dakika steril edilmiştir.

3.6.16. McFarland No. 0.5 Bulanıklık Serisinin Hazırlanması

McFarland serisi, bir sıvıdaki yaklaşık bakteri sayısını standartlaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. McFarland Standardı, baryum klorür ve sülfirik asidin karışımı ile oluşan bulanıklığın, sıvı içeriğinde bulunan bakteri konsantrasyonunun görsel olarak karşılaştırılması amacıyla kullanılmaktadır (McFarland, 1907).

Çalışmada, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının Mc Farland No. 0.5 bulanık serisine göre hazırlanan konsantrasyonları, antibiyotik duyarlılık testi, biyofilm oluşturma aktivitesinin incelenmesi, insan serumuna direnç aktivitesinin değerlendirilmesi ve hemaglutinasyon aktivitelerinin incelenmesinde kullanılmıştır. Mc Farland No. 0.5 bulanık serisine ait bilgiler Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

3.6.17. McFarland No. 1 Bulanıklık Serisinin Hazırlanması

Çalışmada, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının McFarland No. 1 bulanık serisine göre hazırlanan konsantrasyonları, bakteriyosin üretim aktivitesinin incelenmesi, plazmit DNA izolasyonunda bakteri süspansiyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. McFarland No. 1 bulanık serisine ait bilgiler Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

3.6.18. McFarland No. 4 Bulanıklık Serisinin Hazırlanması

Çalışmada, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının McFarland No. 4 bulanık serisine göre hazırlanan konsantrasyonları, API® 20 Strep test kiti ile Enterokok suşlarının tür tayininde kullanılmıştır. McFarland No. 4 bulanık serisine ait bilgiler Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

Tablo 3.9: McFarland No. 0.5, McFarland No.1 ve McFarland No.4 bulanıklık serisinin hazırlanması.

Mc Farland Standardı	%1'lik BaCl ₂ (ml)	%1'lik H ₂ SO ₄ (ml)	Yaklaşık Bakteri Sayısı (kob/ml)
0.5	0.05	9.95	1.5x10 ⁸
1	0.10	9.90	3.0x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹

3.6.19. 1M Tris-HCl Hazırlanışı

Trisma Base 12.1 g

Trisma-Base tartılıp temiz bir 250 ml'lik Erlen Mayer'e konulduktan sonra üzerine 40 ml distile su eklenmiş ve çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH 8'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım, 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiş ve steril 2 ml'lik crio tüplerine eşit şekilde paylaştırılmıştır. Kullanılncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.20. 0.5 M EDTA Hazırlanışı

EDTA 18.1 g

EDTA tartılıp temiz bir 200 ml'lik behere konulduktan sonra üzerine yaklaşık 60 ml steril distile su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. 10 M NaOH ile pH 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım, 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir. Kullanılncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.21. Tris-EDTA Hazırlanışı

1M Tris-HCl 1 ml

0.5 M EDTA 200 µl

Yukarıda belirtilen karışım tartılarak temiz bir 250 ml'lik Erlen Mayere konulduktan sonra üzerine 100 ml distile su eklenmiştir. Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre

ile steril edilmiş ve steril 2 ml'lik crio tüplerine eşit şekilde paylaştırılmıştır. Kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.22. 1M HCl Hazırlanışı

%37'lik HCl	8.4 ml
-------------	--------

İçerisinde 100 ml distile su bulunan temiz bir 200 ml'lik behere, çeker ocak altında %37'lik HCl'den 8.4 ml yavaş yavaş damlatılmıştır. Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilmiştir.

3.6.23. 10M NaOH Hazırlanışı

NaOH	10 g
------	------

NaOH temiz bir 50 ml'lik behere 10 g olacak şekilde tartıldıktan sonra üzerine 25 ml distile su eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Karışım daha sonra 0.22 µm por çaplı enjektör ucu filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.24. 10x TAE Hazırlanışı

Trisma Base	48.44 g
-------------	---------

%100'lük asetik asit	11.42 ml
----------------------	----------

0.5 M EDTA	20 ml
------------	-------

Bidistile su	750 ml
--------------	--------

10x TAE stok solüsyonu hazırlamak için 48.4 g Trisma Base tartılarak temiz bir Erlen Mayere konulmuş ve üzerine 750 ml filtrelenmiş bidistile su eklenerek homojenize edilmiştir. Çeker ocak altında karışım üzerine %100'lük asetik asitten 11.42 ml yavaş yavaş eklenmiştir. Karışıma, 20 ml 0.5 M EDTA eklendikten sonra, filtrelenmiş bidistile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım, otoklavda 121 °C'de 1.2 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra soğumaya bırakılmış ve +4 °C'de mavi kapaklı Schott şişesinde saklanmıştır.

3.6.25. 1x TAE Hazırlanışı

İçerisinde 900 ml filtrelenmiş bidistile su bulunan mavi kapaklı Schott şişe içerisine, önceden hazırlanan 10X TAE stok solüsyonundan 100 ml eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Karışım, otoklavda 121 °C’de 1.2 atm basınçta 15-30 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra soğumaya bırakılmış ve +4 °C’de mavi kapaklı Schott şişesinde saklanmıştır.

3.6.26. %1’lik Agaroz Jel Hazırlanışı

Çalışmada, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının kromozomal DNA izolasyonu, plazmit izolasyonu, antibiyotik direnç ve virulans genlerinin PZR ürünü bant görüntülemesi, 40 kuyucuklu agaroz jel elektroforezi tankında gerçekleştirilmiştir. Deney kapsamında %1’lik agaroz jel kullanılmıştır. Bunun için öncelikle 250 ml’lik Erlen Mayer içerisine 1.7 g agaroz eklenmiştir. Üzerine 170 ml, önceden hazırlanmış 1x TAE eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Karışım, mikrodalgaya konulmuş ve kaynamadan erimesi sağlanmıştır.

3.6.27. %1’lik Kristal Viyole Boyasının Hazırlanışı

Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerini tespit etmek için % 1’lik kristal viyole boyası kullanılmıştır (Di Bonaventura ve diğ., 2007). Bunun için, 200 ml’lik mavi kapaklı Schott şişesi içerisine 99 ml distile su konulmuş üzerine ise 1 ml Kristal Viyole boyası eklenilerek homojenize edilmiş ve kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.6.28. %95’lik Etanol Hazırlanışı

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının biyofilm üretim aktivitelerinin incelenmesinde %1’lik kristal viyole boyasının çözünmesi amacıyla kullanılmıştır (O’Toole ve Kolter, 1998). Bunun için öncelikle temiz bir 100 ml’lik mezür içerisine 95 ml etanol eklenip üzerine 5 ml distile su eklenerek toplam hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır.

3.6.29. %96’lık Etanol Hazırlanışı

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının kromozomal DNA izolasyonu prosedüründe kullanılmıştır. Bunun için öncelikle temiz bir 100 ml’lik mezür içerisine 96 ml etanol eklenip üzerine 4 ml distile su eklenerek toplam hacim 100 ml’ye tamamlanmıştır.

3.6.30. %35 Gliserol Hazırlanışı

Deniz suyundan izole edilen bakterilerin stok suşlar olarak saklanmasında kullanılmıştır. Saf gliserol, distile su ile % 35 oranında sulandırılmış ve karışım 121°C’de 1.2 atmosfer basınçta 15-30 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Feltham ve diğ., 1978).

3.6.31. Lizozim Solüsyonu Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının kromozomal DNA izolasyonu prosedüründe, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının parçalanmasında kullanılan bir çözüldür.

Lizozim Solüsyonu içeriği;

Lizozim	20 mg
Tris-HCl	20 mM (pH 8.0)
EDTA	2 mM
Triton X-100	%1.2

1.5 ml’lik Eppendorf tüpü içersine steril şartlar altında 1 ml Tris-EDTA (TE) eklenmiş ve üzerine 12 µl Triton X-100 eklenerek homojenize edilmiştir. Triton X-100 çözünmesi zor olan bir kimyasal olduğundan 37 °C’lik su banyosunda çözününceye kadar bekletilmiştir. Homojenize olan karışım üzerine, steril şartlar altında 0.02 g lizozim eklenmiş ve vortekslenildikten sonra kullanıma hazır hale gelmiştir. Her örnek için DNA izolasyonunda, lizozim solüsyonu taze olarak hazırlanmıştır.

3.6.32. IDPURE™ Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit İçeriği Hazırlanışı

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının kromozomal DNA izolasyonunda kullanılan IDPURE™ Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit (IDLabs™, Canada) içeriğinde bulunan kimyasalların hazırlığı yapılmıştır.

Kullanımdan önce, kit içeriğinde bulunan ve yıkama solüsyonu olarak kullanılması amaçlanan 26 ml CW1 solüsyonuna, 34 ml %100’lük etanol eklenmiş ve son hacim 60 ml’ye tamamlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Kullanımdan önce, kit içeriğinde bulunan ve yıkama solüsyonu olarak kullanılması amaçlanan 18 ml CW2 solüsyonuna, 42 ml %100'lük etanol eklenmiş ve son hacim 60 ml'ye tamamlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.33. Antibiyotik Direnç Genlerini Belirlemede Kullanılan Primer Setlerinin Hazırlanışı

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının antibiyotik direnç gen bölgelerine ait primer dizisi ve kullanılan primerlerden 100 µM stok yapmak için eklenen Tris-EDTA (TE) hacmi (µl) Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10: Antibiyotik direnç gen bölgelerini belirlemede kullanılan primerler ve 100 µM stok primer seti hazırlamada kullanılan TE Buffer hacmi (µl).

Antibiyotik Direnç Geni	Antibiyotik Adı	Primer Dizisi	TE Buffer hacmi (µl)
<i>vanA</i>	Vankomisin	(F) 5' GGGAAAACGACAATTGC 3'	(F) 97 µl
		(R) 3' GTACAATGCGGCCGTTA 5'	(R) 107 µl
<i>vanB</i>	Vankomisin	(F) 5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3'	(F) 101 µl
		(R) 3' GATTTCGTTCCCTCGACC 5'	(R) 120 µl
<i>ant(6)-la</i>	Streptomisin	(F) 5' ACTGGCTTAATCAATTTGGG 3'	(F) 90 µl
		(R) 3' GCCTTCCGCCACCTCACCG 5'	(R) 108 µl
<i>acc(6')-aph(2'')</i>	Gentamisin	(F) 5' CCAAGAGCAATAAGGGCATAACC 3'	(F) 77 µl
		(R) 3' ACCCTCAAAAAGTGTGTTGC 5'	(R) 88 µl
<i>aphA-3</i>	Kanamisin	(F) 5' GCCGATGTGGATTGCGAAAA 3'	(F) 86 µl
		(R) 3' GCTTGATCCCCAGTAAGTCA 5'	(R) 93 µl
<i>rpoB1</i>	Rifampisin	(F) 5' GTCCGTTTCGGCTTTAATATA 3'	(F) 90 µl
		(R) 3' AAGAAACGAGCATTTCAGCAA 5'	(R) 81 µl
<i>rpoB2</i>	Rifampisin	(F) 5' CGCAAGCGACTCAAGAACAG 3'	(F) 85 µl
		(R) 3' GAGCAAATGTTCCATCTTCA 5'	(R) 91 µl
<i>bla(Z)</i>	Ampisilin	(F) 5' TACAACGTAAATATCGGAGGG 3'	(F) 81 µl
		(R) 3' CAATAGTTTCAGATTGGCCC 5'	(R) 91 µl
<i>ermB</i>	Eritromisin	(F) 5' CATTTAACGACGAAACTGGC 3'	(F) 88 µl
		(R) 3' GGAACATCTGTGGTATGGCG 5'	(R) 89 µl
<i>catpIP</i>	Kloramfenikol	(F) 5' GGATATGAAATTTATCCCTC 3'	(F) 90 µl
		(R) 3' CAATCATCTACCCTATGAAT 5'	(R) 91 µl
<i>tetM</i>	Tetrasiklin	(F) 5' GTTAAATAGTGTCTTGGAG 3'	(F) 87 µl
		(R) 3' CTAAGATATGGCTCTAACAA 5'	(R) 86 µl
<i>tetL</i>	Tetrasiklin	(F) 5' CATTTGGTCTTATTGGATCG 3'	(F) 95 µl
		(R) 3' ATTACACTCCGATTTCGG 5'	(R) 101 µl

(F): Forward primer; (R): Reverse primer.

Örneklerdeki antibiyotik direnç gen bölgelerini belirlemede kullanılan 10 µM primer setini (forward ve reverse primer) hazırlamak için 100 µM stok primer setinin her birinden 10 µl alınarak steril mavi kapaklı 2 ml'lik Eppendorf tüplerine paylaştırılmış ve üzerine steril TE Buffer'dan 90 µl eklenerek kullanıma hazır hale gelmiştir. Tüm primer setleri +4 °C'de saklanmıştır.

3.6.34. Virulans Genlerini Belirlemede Kullanılan Primer Setlerinin Hazırlanışı

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının virulans gen bölgelerine ait primer dizisi ve kullanılan primerlerden 100 µM stok yapmak için eklenen Tris-EDTA (TE) hacmi (µl) Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11: Virulans gen bölgelerini belirlemede kullanılan primerler ve 100 µM stok primer seti hazırlamada kullanılan TE Buffer hacmi (µl).

Virulans Geni	Primer Dizisi	TE Buffer hacmi (µl)
<i>ace</i>	(F) 5' AAAGTAGAATTAGATCCACAC 3'	(F) 78 µl
	(R) 3' TCTATCACATTCGGTTGCG 5'	(R) 102 µl
<i>gel E</i>	(F) 5' AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC 3'	(F) 89 µl
	(R) 3' CTTCATTATTTACACGTTTG 5'	(R) 96 µl
<i>agg</i>	(F) 5' AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC 3'	(F) 72 µl
	(R) 3' AAACGGCAAGACAAGTAAATA 5'	(R) 74 µl
<i>esp</i>	(F) 5' TTGCTAATGCTAGTCCACGACC 3'	(F) 86 µl
	(R) 3' GCGTCAACACTTGCAATGCCGAA 5'	(R) 80 µl
<i>fsr</i>	(F) 5' AACCAGAATCGACCAATGAAT 3'	(F) 79 µl
	(R) 3' GCCCCTCATAACTCAATACC 5'	(R) 96 µl
<i>cylM</i>	(F) 5' CTGATGGAAAGAAGATAGTAT 3'	(F) 76 µl
	(R) 3' TGAGTTGGTCTGATTACATTT 5'	(R) 88 µl
<i>cylB</i>	(F) 5' ATTCTACCTATGTTCTGTTA 3'	(F) 85 µl
	(R) 3' AATAAACTCTTCTTTCCAAC 5'	(R) 89 µl
<i>cylA</i>	(F) 5' TGGATGATGATAGGAAGT 3'	(F) 78 µl
	(R) 3' TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA 5'	(R) 88 µl
<i>efaAfs</i>	(F) 5' GACAGACCCTCACGAATA 3'	(F) 97 µl
	(R) 3' AGTTCATCATGCTGTAGTA 5'	(R) 95 µl
<i>efaAfm</i>	(F) 5' AACAGATCCGCATGAATA 3'	(F) 93 µl
	(R) 3' CATTCATCATCTGATAGTA 5'	(R) 91 µl
<i>cpd</i>	(F) 5' TGTTGGGTTATTTTCAATTC 3'	(F) 91 µl
	(R) 3' TACGGCTCTGGCTTACTA 5'	(R) 108 µl
<i>cob</i>	(F) 5' AACATTCAGCAAACAAAGC 3'	(F) 86 µl
	(R) 3' TTGTCATAAAGAGTGGTCAT 5'	(R) 87 µl
<i>ccf</i>	(F) 5' GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG 3'	(F) 75 µl
	(R) 3' AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT 5'	(R) 79 µl

(F): Forward primer; (R): Reverse primer.

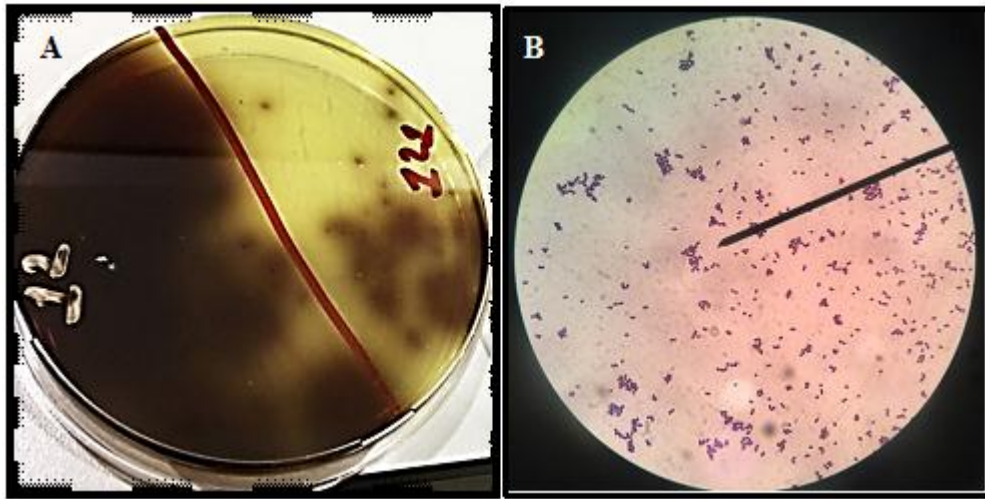
Örneklerdeki virulans gen bölgelerini belirlemede kullanılan 10 µM primer setini (forward ve reverse primer) hazırlamak için 100 µM stok primer setinin her birinden 10 µl alınarak steril mavi kapaklı 2 ml’lik Eppendorf tüplerine paylaştırılmış ve üzerine steril TE Buffer’dan 90 µl eklenerek kullanıma hazır hale gelmiştir. Tüm primer setleri +4 °C’de saklanmıştır.

4. BULGULAR

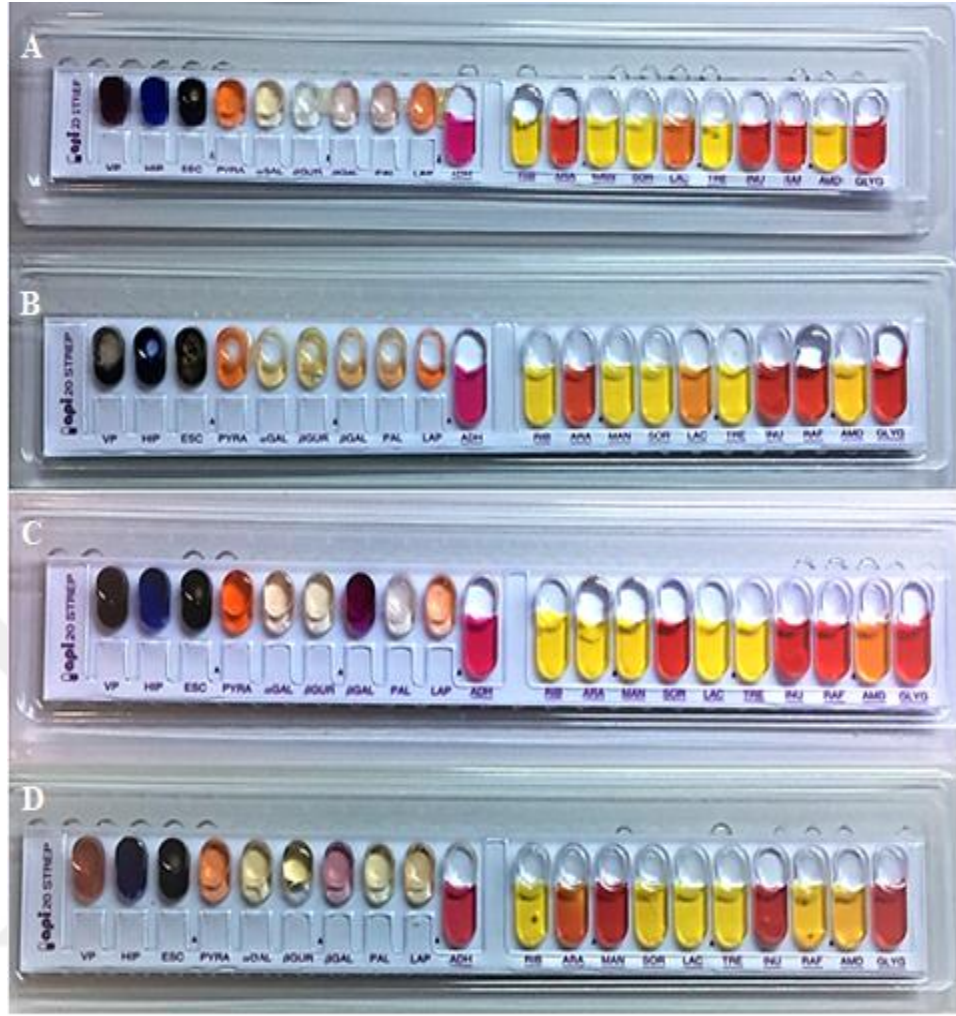
Bu çalışmada, daha önceki bir çalışmada (Kimiran Erdem ve diğ., 2007), deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun API®20 Strep test kiti ile doğrulaması yapılmıştır. Daha sonra tüm örneklerin antibiyotik direnç profilleri ve virulans faktörleri fenotipik ve genotipik olarak incelenmiş ve plazmit profil büyüklükleri belirlenmiştir.

4.1. ENTEROKOK SUŞLARININ API®20 STREP TEST KİTİ İLE TANIMLANMASI

Deniz suyundan izole edilen Gram pozitif kok, katalaz negatif, Bile Esculin Agar besiyerinde siyah halo ile çevrelenmiş koloni morfolojisine sahip, eskulin hidrolizi pozitif olan ve %6.5 NaCl içeren besiyerinde üreyen koloniler Enterokok olarak değerlendirilmiş (Şekil 4.1) ve 20 mikrotüpten oluşan API®20 Strep (Biomeriux, France) test sistemi kullanılarak tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1: **A:** Enterokok suşlarına ait Bile Esculin Agar besiyeri üzerindeki koloni morfolojisi görüntüleri (AE12 ve AE13 suşu), **B:** Enterokok suşuna ait Gram boyama görüntüsü (100x büyütme).



Şekil 4.2: Enterokok suşlarının API®20 Strep test kiti identifikasyon sonuçları. **A:** Pozitif kontrol *E. faecalis* ATCC 29212 suşu, **B:** AE1, **C:** AE48, **D:** AE66.

Deniz suyundan izole elde edilen 66 Enterokok suşuna ait tür tayini sonuçları, apiweb (Biomeriux, France) identifikasyon yazılım sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonrasında, deniz suyundan izole edilen toplam 66 Enterokok suşundan 46'sı (%69.7) *Enterococcus faecalis*, 19'u (%28.79) *Enterococcus faecium*, biri ise *Enterococcus gallinarum* olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: İzole edilen Enterokok suşlarının API®20 Strep test kiti ile tür dağılımı.

Bakteri Adı	n	%
<i>Enterococcus faecalis</i>	46	69.7
<i>Enterococcus faecium</i>	19	28.79
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1.51

n: izole edilen suş sayısı.

API®20 Strep test kiti biyokimyasal identifikasyon sonuçlarından elde edilen verilere göre çalışmada kullanılan tüm Enterokok suşlarına yeni kod numaraları verilmiştir. Buna göre

AE1-AE46 *E. faecalis*, AE47-AE65 *E. faecium*, AE66 ise *E. gallinarum* suşunu belirtmektedir.

4.2. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ

4.2.1. Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun antibiyotik duyarlılık deneyleri Kirby-Bauer Antibiyotik Disk Difüzyon Yöntemi ile yapılmış ve Clinical and Laboratory Standards Institute'un (CLSI) 2016 kriterlerine göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Çalışma kapsamında kullanılan 66 Enterokok suşunun antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, suşların tümünün nalidiksik asit (NA), amikasin (AK) ve rifampisine (RIF) ve karşı dirençli olduğu, buna karşın 60 suşun streptomisine (S) karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2). Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun penisilin (P), kloramfenikol (C), vankomisin (VA), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP), kanamisin (K), ampisilin (AM), eritromisin (E) ve gentamisin (CN) antibiyotiklerine karşı direnç oranları ise sırasıyla, % 66.66, % 16.66, % 45.45, % 54.54, % 22.72, % 95.46, % 45.45, % 60.6 ve % 98.48 olarak saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.2: Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.

Bakteri No.	Antibiyotikler												
	NA	S	P	C	VA	TE	CIP	K	AK	AM	E	CN	RIF
AE1	Di	Du	Du	Du	Yd	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE2	Di	Du	Du	Du	Yd	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE3	Di	Du	Di	Du	Yd	Di	Yd	Yd	Di	Du	Yd	Di	Di
AE4	Di	Du	Di	Du	Yd	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE5	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE6	Di	Du	Di	Du	Yd	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE7	Di	Du	Di	Yd	Yd	Yd	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE8	Di	Du	Di	Du	Yd	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE9	Di	Du	Du	Du	Yd	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE10	Di	Du	Du	Du	Du	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE11	Di	Du	Di	Yd	Yd	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE12	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE13	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE14	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE15	Di	Du	Di	Du	Yd	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE16	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di

Du: Duyarlı, Yd: Yarı-duyarlı, Di: Dirençli, SB: Standart bakteri.

Tablo 4.2(devam): Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.

Bakteri No.	Antibiyotikler												
	NA	S	P	C	VA	TE	CIP	K	AK	AM	E	CN	RIF
AE17	Di	Du	Du	Yd	Yd	Di	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE18	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE19	Di	Du	Di	Yd	Yd	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE20	Di	Du	Du	Yd	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE21	Di	Du	Du	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE22	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Di	Yd	Di	Di
AE23	Di	Du	Du	Du	Di	Du	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE24	Di	Du	Du	Du	Di	Du	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE25	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE26	Di	Du	Di	Du	Yd	Du	Du	Di	Di	Di	Yd	Di	Di
AE27	Di	Du	Di	Du	Yd	Du	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE28	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE29	Di	Du	Di	Yd	Di	Du	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE30	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE31	Di	Du	Du	Yd	Di	Yd	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE32	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE33	Di	Du	Du	Du	Di	Du	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE34	Di	Du	Di	Yd	Du	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE35	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE36	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE37	Di	Du	Du	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE38	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE39	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Di	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE40	Di	Du	Du	Yd	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Yd	Di	Di
AE41	Di	Du	Di	Du	Du	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE42	Di	Du	Di	Du	Du	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE43	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE44	Di	Du	Du	Du	Yd	Du	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE45	Di	Du	Du	Yd	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE46	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE47	Di	Du	Di	Yd	Du	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE48	Di	Du	Di	Yd	Yd	Du	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE49	Di	Du	Di	Du	Yd	Du	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE50	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE51	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE52	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE53	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Di	Di	Di	Yd	Di	Di
AE54	Di	Yd	Du	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE55	Di	Yd	Di	Yd	Di	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE56	Di	Du	Du	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE57	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE58	Di	Du	Di	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE59	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Yd	Di	Di	Du	Di	Di	Di
AE60	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE61	Di	Du	Di	Di	Di	Di	Yd	Di	Di	Di	Yd	Di	Di
AE62	Di	Du	Di	Du	Du	Yd	Di	Di	Di	Di	Yd	Yd	Di
AE63	Di	Yd	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE64	Di	Du	Di	Du	Du	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di	Di
AE65	Di	Du	Du	Du	Yd	Du	Di	Yd	Di	Di	Di	Di	Di
AE66	Di	Du	Di	Du	Yd	Du	Yd	Yd	Di	Di	Di	Di	Di
SB	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di	Di

Du: Duyarlı, Yd: Yarı-duyarlı, Di: Dirençli, SB: Standart bakteri.

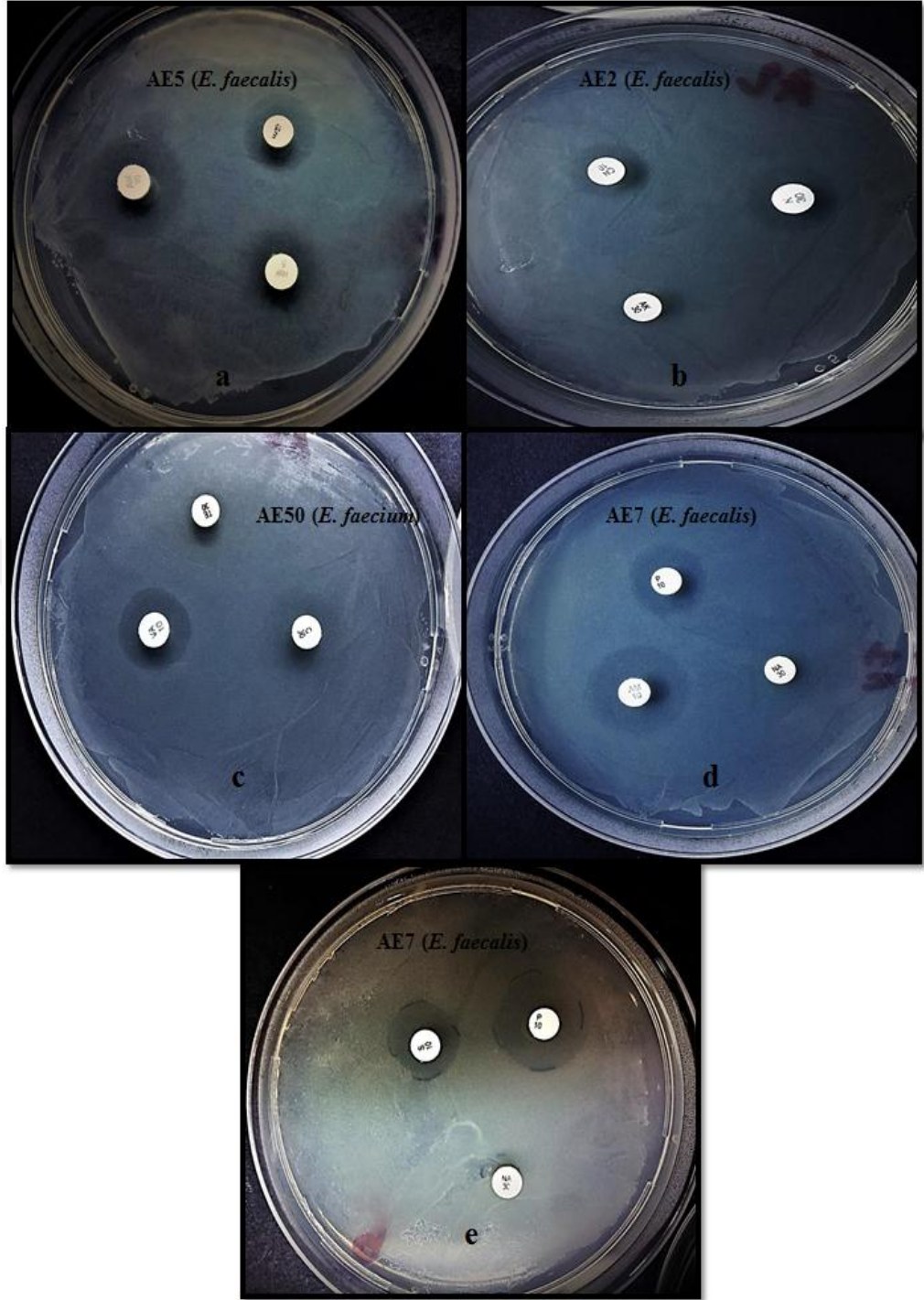
Çalışmada, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları.

Antibiyotik	Antibiyotik duyarlılık oranları (%)		
	Du n (%)	Yd n (%)	Di n (%)
NA	0 (0)	0 (0)	66 (100)
S	61 (92.42)	5 (7.58)	0 (0)
P	22 (33.34)	0 (0)	44 (66.66)
C	32 (48.48)	23 (34.84)	11 (16.66)
VA	17 (25.27)	19 (28.78)	30 (45.45)
TE	27 (40.90)	3 (4.56)	36 (54.54)
CIP	9 (13.63)	42 (63.65)	15 (22.72)
K	0 (0)	2 (4.54)	64 (95.46)
AK	0 (0)	0 (0)	66 (100)
AM	36 (54.54)	0 (0)	30 (45.46)
E	0 (0)	26 (39.4)	40 (60.6)
CN	0 (0)	1 (1.51)	65 (98.49)
RIF	0 (0)	0 (0)	66 (100)

Du: Duyarlı, Yd: Yarı-duyarlı, Di: Dirençli, n: Bakteri sayısı,
%: Yüzde.

Tablo 4.2 ve Tablo 4.3 incelendiğinde; *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içerdiği belirlenen 66 Enterokok suşunun, streptomisin (S), penisilin (P), kloramfenikol (C), vankomisin (VA), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP), ampisilin (AM), antibiyotiklerine karşı duyarlılık oranları sırasıyla %92.42, %33.34, %48.48, %25.27, %40.90, %13.63 ve %54.54 olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının, streptomisin (S), kloramfenikol (C), vankomisin (VA), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP), kanamisin (K), eritromisin (E) ve gentamisin (CN) antibiyotiklerine karşı gösterdiği yarı-duyarlılık yüzdelerinin sırası ise; %7.58, %34.84, %28.78, %4.56, %63.65, %4.54, %39.4 ve %1.51 olduğu saptanmıştır. Tüm suşların nalidiksik asit (NA), amikasin (AK) ve rifampisin (RIF) antibiyotiklerine dirençli olduğu belirlenmiştir. Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi'ne göre, farklı antibiyotiklere karşı MHA besiyeri üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon görüntüleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Enterokok suşlarının antibiyotik diskleri etrafında oluşturduğu inhibisyon zonları. **a:** AM(10), E(15) ve RIF(5); **b:** AK(30), K(30) ve CN(10); **c:** VA(10), TE(30) ve C(30); **d:** AM(10), P(10) ve NA(30); **e:** S(10), P(10) ve NA(30) antibiyotiklerine karşı oluşturduğu zon görüntüsü. AK(30): Amikasin, AM(10): Ampisilin, C (30): Kloramfenikol, CN(10): Gentamisin, E(15): Eritromisin, K(30): Kanamisin, NA (30): Nalidiksik asit, P(10): Penisilin, RIF(5): Rifampisin, S(10): Streptomisin, TE(30): Tetrasiklin, VA(10): Vankomisin.

Çalışma sonucunda, incelenen Enterokok suşlarından *E. faecalis*'in *E. faecium*'a göre genel olarak daha yüksek oranda antibiyotik direnç profili gösterdiği belirlenmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları arasında kloramfenikol, vankomisin, kanamisin, tetrasiklin, ampisilin ve gentamisin direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Diğer yandan, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının siprofloksasin, penisilin ve eritromisin direnci açısından aralarında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) sonucuna varılmıştır. Çalışmada antibiyotik direnci fenotipik açıdan genel olarak değerlendirildiğinde, *E. faecalis* suşunun *E. faecium*'a göre daha yüksek oranda antibiyotik direncine sahip olduğu belirlenmiştir.

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun, antibiyotik direnç profilleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir. 66 Enterokok suşunun çoklu antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5); çoklu antibiyotik profilinin 5-11 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada, 66 Enterokok suşundan 3 *E. faecalis* suşu ve 5 *E. faecium* suşu olmak üzere toplam 8 Enterokok suşunun en fazla 11 farklı antibiyotiğe, 3 *E. faecalis* (AE9, AE14 ve AE32) suşunun ise en az 5 antibiyotiğe karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Diğer yandan 6 Enterokok suşunun 10 farklı antibiyotiğe, 14 Enterokok suşunun 9, 11 Enterokok suşunun 8, 10 Enterokok suşunun 7, 14 Enterokok suşunun 6 ve 3 Enterokok suşunun ise 5 farklı antibiyotiğe karşı çoklu direnç geliştirdiği tespit edilmiştir.

Tablo 4.4: Enterokok suşlarının antibiyotik direnç profilleri.

Bakteri No.	Antibiyotik Direnç Profili	Dirençli Antibiyotik Sayısı	Bakteri No.	Antibiyotik Direnç Profili	Dirençli Antibiyotik Sayısı
AE1	NA, TE, K, AK, CN, RIF	6	AE35	NA, P, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	10
AE2	NA, TE, K, AK, CN, RIF	6	AE36	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	11
AE3	NA, P, TE, AK, CN, RIF	6	AE37	NA, C, VA, TE, K, AK, E, CN, RIF	9
AE4	NA, P, TE, K, AK, CN, RIF	7	AE38	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	11
AE5	NA, P, VA, TE, K, AK, CN, RIF	8	AE39	NA, P, CIP, K, AK, CN, RIF	7
AE6	NA, P, K, AK, CN, RIF	6	AE40	NA, VA, CIP, K, AK, CN, RIF	7
AE7	NA, P, K, AK, CN, RIF	6	AE41	NA, P, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	9
AE8	NA, P, K, AK, CN, RIF	6	AE42	NA, P, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	9
AE9	NA, K, AK, CN, RIF	5	AE43	NA, P, VA, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	10
AE10	NA, TE, K, AK, CN, RIF	6	AE44	NA, CIP, K, AK, E, CN, RIF	7
AE11	NA, P, TE, K, AK, CN, RIF	7	AE45	NA, VA, CIP, K, AK, E, CN, RIF	8
AE12	NA, P, K, AK, CN, RIF	6	AE46	NA, K, AK, E, CN, RIF	6
AE13	NA, P, K, AK, CN, RIF	6	AE47	NA, P, TE, K, AK, E, CN, RIF	8
AE14	NA, K, AK, CN, RIF	5	AE48	NA, P, CIP, K, AK, E, CN, RIF	8
AE15	NA, P, TE, K, AK, CN, RIF	7	AE49	NA, P, CIP, K, AK, E, CN, RIF	8
AE16	NA, P, VA, TE, K, AK, CN, RIF	8	AE50	NA, P, VA, TE, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF	11
AE17	NA, TE, K, AK, CN, RIF	6	AE51	NA, P, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF	9
AE18	NA, C, P, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	11	AE52	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	11
AE19	NA, P, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	AE53	NA, P, AK, AM, CN, RIF	6
AE20	NA, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	AE54	NA, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9
AE21	NA, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	10	AE55	NA, P, VA, TE, K, AK, E, CN, RIF	9
AE22	NA, K, AK, AM, CN, RIF	6	AE56	NA, C, VA, TE, K, AK, E, CN, RIF	9
AE23	NA, VA, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	AE57	NA, P, C, VA, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	11
AE24	NA, VA, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	AE58	NA, P, VA, TE, K, AK, E, CN, RIF	9
AE25	NA, P, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	10	AE59	NA, P, C, VA, K, AK, E, CN, RIF	9
AE26	NA, P, K, AK, AM, CN, RIF	7	AE60	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	11
AE27	NA, P, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	AE61	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, CN, RIF	10
AE28	NA, P, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	10	AE62	NA, P, CIP, K, AK, AM, RIF	7
AE29	NA, P, VA, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	AE63	NA, P, VA, TE, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF	11
AE30	NA, P, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	AE64	NA, P, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9
AE31	NA, VA, K, AK, CN, RIF	6	AE65	NA, CIP, AK, AM, E, CN, RIF	7
AE32	NA, K, AK, CN, RIF	5	AE66	NA, P, AK, AM, E, CN, RIF	7
AE33	NA, VA, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	SB	NA, S, P, C, TE, VA, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF	13
AE34	NA, P, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9			

NA: Nalidiksik asit, **S:** Streptomisin, **P:** Penisilin, **C:** Kloramfenikol, **VA:** Vankomisin, **TE:** Tetrasiklin, **CIP:** Siprofloksasin, **K:** Kanamisin, **AK:** Amikasin, **AM:** Ampisilin, **E:** Eritromisin, **CN:** Gentamisin, **RIF:** Rifampisin, **SB:** Standart bakteri.

Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının çoklu antibiyotik direnç profillerinin *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türleri arasındaki değerlendirme sonuçları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.



Tablo 4.5: Enterokok suşlarının çoklu antibiyotik direnci.

Direnç Profili No.	Çoklu Direnç Profili	Dirençli Antibiyotik Sayısı	Bakteri Adı			Toplam n (%)
			<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	
1	NA, K, AK, CN, RIF	5	3 (%6.5)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%4.54)
2	NA, TE, K, AK, CN, RIF	6	4 (%8.7)	0 (%0)	0 (%0)	4 (%6.06)
3	NA, P, K, AK, CN, RIF	6	5 (%10.8)	0 (%0)	0 (%0)	5 (%7.57)
4	NA, P, TE, AK, CN, RIF	6	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
5	NA, P, AK, AM, CN, RIF	6	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
6	NA, K, AK, AM, CN, RIF	6	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
7	NA, K, AK, E, CN, RIF	6	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
8	NA, VA, K, AK, CN, RIF	6	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
9	NA, P, TE, K, AK, CN, RIF	7	3 (%6.5)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%4.54)
10	NA, P, K, AK, AM, CN, RIF	7	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
11	NA, P, CIP, K, AK, CN, RIF	7	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
12	NA, VA, CIP, K, AK, CN, RIF	7	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
13	NA, CIP, K, AK, E, CN, RIF	7	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
14	NA, CIP, AK, AM, E, CN, RIF	7	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
15	NA, P, CIP, K, AK, AM, RIF	7	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
16	NA, P, AK, AM, E, CN, RIF	7	0 (%0)	0 (%0)	1 (%100)	1 (%1.51)
17	NA, VA, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	3 (%6.5)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%4.54)
18	NA, P, K, AK, AM, E, CN, RIF	8	2 (%4.3)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
19	NA, P, VA, TE, K, AK, CN, RIF	8	2 (%4.3)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
20	NA, P, TE, K, AK, E, CN, RIF	8	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
21	NA, P, CIP, K, AK, E, CN, RIF	8	0 (%0)	2 (%10.5)	0 (%0)	2 (%3.03)
22	NA, VA, CIP, K, AK, E, CN, RIF	8	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
23	NA, P, C, VA, K, AK, E, CN, RIF	9	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
24	NA, P, VA, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
25	NA, P, VA, TE, K, AK, E, CN, RIF	9	0 (%0)	2 (%10.5)	0 (%0)	2 (%3.03)
26	NA, P, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
27	NA, P, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	2 (%4.3)	1 (%5.3)	0 (%0)	3 (%4.54)
28	NA, P, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	9	2 (%4.3)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
29	NA, C, VA, TE, K, AK, E, CN, RIF	9	1 (%2.2)	1 (%5.3)	0 (%0)	2 (%3.03)
30	NA, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	10	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
31	NA, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	9	1 (%2.2)	1 (%5.3)	0 (%0)	2 (%3.03)
32	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, CN, RIF	10	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)
33	NA, P, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	10	3 (%6.5)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%4.54)
34	NA, P, VA, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	10	1 (%2.2)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
35	NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF	11	3 (%6.5)	2 (%10.5)	0 (%0)	5 (%7.57)
36	NA, P, VA, TE, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF	11	0 (%0)	2 (%10.5)	0 (%0)	2 (%3.03)
37	NA, P, C, VA, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF	11	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)	1 (%1.51)

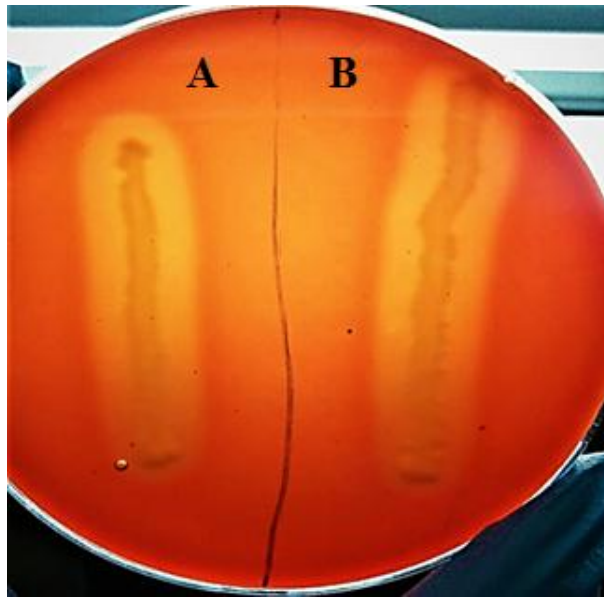
NA: Nalidiksik asit, **S:** Streptomisin, **P:** Penisilin, **C:** Kloramfenikol, **VA:** Vankomisin, **TE:** Tetrasiklin, **CIP:** Siprofloksasin, **K:** Kanamisin,

AK: Amikasin, **AM:** Ampisilin, **E:** Eritromisin, **CN:** Gentamisin, **RIF:** Rifampisin, **n:** Sayı, **%:** Yüzde.

Enterokok suşlarının 37 farklı çoklu direnç profili geliştirdikleri belirlenmiştir (Tablo 4.5). Çalışma sonucunda, 3 (%6.5) *E. faecalis* suşunun en az 5 (NA, K, AK, CN, RIF) farklı antibiyotiğe karşı çoklu direnç geliştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca, 2 (%10.5) *E. faecalis* ve 2 (%10.5) *E. faecium* (NA, P, C, VA, TE, K, AK, AM, E, CN, RIF), 2 (%10.5) *E. faecium* (NA, P, VA, TE, CIP, K, AK, AM, E, CN, RIF) ve 1 (%5.3) *E. faecium* (NA, P, C, VA, TE, CIP, K, AK, E, CN, RIF) suşunun en fazla 11 farklı antibiyotik profiline karşı çoklu direnç geliştirdiği saptanmıştır. *E. gallinarum* suşunun 7 (NA, P, AK, AM, E, CN, RIF) antibiyotiğe karşı çoklu direnç geliştirdiği tespit edilmiştir.

4.2.2. Hemoliz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Deniz suyundan izole edilen, Gram pozitif kok, katalaz negatif özellik gösteren, Bile Esculin Agar besiyerinde siyah halo ile çevrelenmiş koloni oluşturan ve API[®]20 Strep test kiti ile tür tanımlaması yapılmış 66 Enterokok suşunun hemoliz aktiviteleri değerlendirmek amacıyla tüm örnekler %5 koyun kanı içeren Columbia Agar (Becton-Dickinson, Germany) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Tüm Petri kutuları 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda %5 koyun kanı içeren Columbia Agar besiyeri üzerinde hemoliz özellikleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: %5 koyun kanı içeren Columbia Agar besiyerinde β-hemoliz. **A:** *E. faecalis* ATCC 29212, **B:** AE1 Enterokok suşu.

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun hemoliz aktiviteleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6: Enterokok suşlarının hemoliz aktiviteleri.

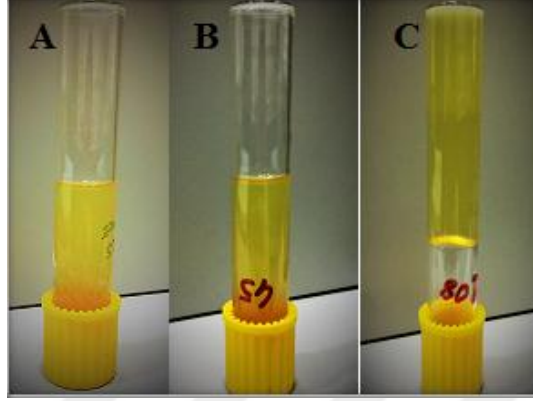
Bakteri No.	Hemoliz Türü (24. saat) / (48. saat)			Bakteri No.	α -hemoliz	β -hemoliz	γ -hemoliz
	α -hemoliz	β -hemoliz	γ -hemoliz				
AE1	-/-	+/+	-/-	AE34	-/-	+/+	-/-
AE2	-/-	+/+	-/-	AE35	-/-	+/+	-/-
AE3	-/-	+/+	-/-	AE36	-/-	+/+	-/-
AE4	-/-	+/+	-/-	AE37	-/-	+/+	-/-
AE5	-/-	+/+	-/-	AE38	-/-	+/+	-/-
AE6	-/-	+/+	-/-	AE39	-/-	+/+	-/-
AE7	-/-	+/+	-/-	AE40	-/-	+/+	-/-
AE8	-/-	+/+	-/-	AE41	-/-	+/+	-/-
AE9	-/-	+/+	-/-	AE42	-/-	+/+	-/-
AE10	-/-	+/+	-/-	AE43	-/-	+/+	-/-
AE11	-/-	+/+	-/-	AE44	-/-	+/+	-/-
AE12	-/-	+/+	-/-	AE45	-/-	+/+	-/-
AE13	-/-	+/+	-/-	AE46	-/-	+/+	-/-
AE14	-/-	+/+	-/-	AE47	-/-	+/+	-/-
AE15	-/-	+/+	-/-	AE48	-/-	+/+	-/-
AE16	-/-	+/+	-/-	AE49	-/-	+/+	-/-
AE17	-/-	+/+	-/-	AE50	-/-	+/+	-/-
AE18	-/-	+/+	-/-	AE51	-/-	+/+	-/-
AE19	-/-	+/+	-/-	AE52	-/-	+/+	-/-
AE20	-/-	+/+	-/-	AE53	-/-	+/+	-/-
AE21	-/-	+/+	-/-	AE54	-/-	+/+	-/-
AE22	-/-	+/+	-/-	AE55	-/-	+/+	-/-
AE23	-/-	+/+	-/-	AE56	-/-	+/+	-/-
AE24	-/-	+/+	-/-	AE57	-/-	+/+	-/-
AE25	-/-	+/+	-/-	AE58	-/-	+/+	-/-
AE26	-/-	+/+	-/-	AE59	-/-	+/+	-/-
AE27	-/-	+/+	-/-	AE60	-/-	+/+	-/-
AE28	-/-	+/+	-/-	AE61	-/-	+/+	-/-
AE29	-/-	+/+	-/-	AE62	-/-	+/+	-/-
AE30	-/-	+/+	-/-	AE63	-/-	+/+	-/-
AE31	-/-	+/+	-/-	AE64	-/-	+/+	-/-
AE32	-/-	+/+	-/-	AE65	-/-	+/+	-/-
AE33	-/-	+/+	-/-	AE66	-/-	+/+	-/-
				SB1	+/+	-/-	-/-
				SB2	-/-	+/+	-/-
				SB3	-/-	-/-	+/+

SB1: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, **SB2:** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **SB3:** *Escherichia coli* ATCC 25922.

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun hemoliz aktivitelerinin değerlendirildiği Tablo 4.5 incelendiğinde; *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarını içeren tüm örneklerin besiyerinde berrak zon oluşturduğu ve sonuç olarak β -hemolitik aktivite gösterdiği ve hemolitik aktivitenin zamana bağlı olarak değişmediği belirlenmiştir. Hemoliz aktivitesinin incelendiği tüm Enterokok suşlarının α ve γ hemoliz aktivitesi göstermediği saptanmıştır.

4.2.3. Jelatinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

%4 jelatin içeren besiyerine ekilen suşlar, uygun sıcaklık ve süreler sonunda jelatinaz aktivitesi açısından incelenmiş ve besiyerinde sıvılaşıma olan tüplerdeki bakterilerin jelatinaz aktivitesine sahip olduğu kabul edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Enterokok suşlarına ait jelatinaz aktivite görüntüleri. **A:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212), **B:** AE45 Enterokok suşu (jelatinaz +), **C:** AE62 Enterokok suşu (jelatinaz -).

Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarına ait jelatinaz aktivitesi sonuçları Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Enterokok suşlarının jelatinaz aktiviteleri.

Bakteri No.	Jelatinaz Aktivitesi	Bakteri No.	Jelatinaz Aktivitesi	Bakteri No.	Jelatinaz Aktivitesi	Bakteri No.	Jelatinaz Aktivitesi
AE1	+	AE18	+	AE35	+	AE52	+
AE2	+	AE19	+	AE36	+	AE53	+
AE3	-	AE20	+	AE37	+	AE54	+
AE4	+	AE21	-	AE38	+	AE55	+
AE5	+	AE22	+	AE39	+	AE56	+
AE6	+	AE23	+	AE40	-	AE57	+
AE7	+	AE24	+	AE41	+	AE58	+
AE8	+	AE25	+	AE42	+	AE59	+
AE9	+	AE26	+	AE43	+	AE60	+
AE10	+	AE27	+	AE44	+	AE61	+
AE11	+	AE28	+	AE45	+	AE62	-
AE12	+	AE29	+	AE46	+	AE63	+
AE13	+	AE30	+	AE47	+	AE64	+
AE14	+	AE31	+	AE48	+	AE65	+
AE15	+	AE32	+	AE49	+	AE66	+
AE16	+	AE33	+	AE50	-	SB	+
AE17	-	AE34	+	AE51	+	Negatif kontrol	-

SB: Standart bakteri.

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının jelatinaz aktivitesine ait oranlar, Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: Enterokok suşlarının jelatinaz aktivitesi oranları.

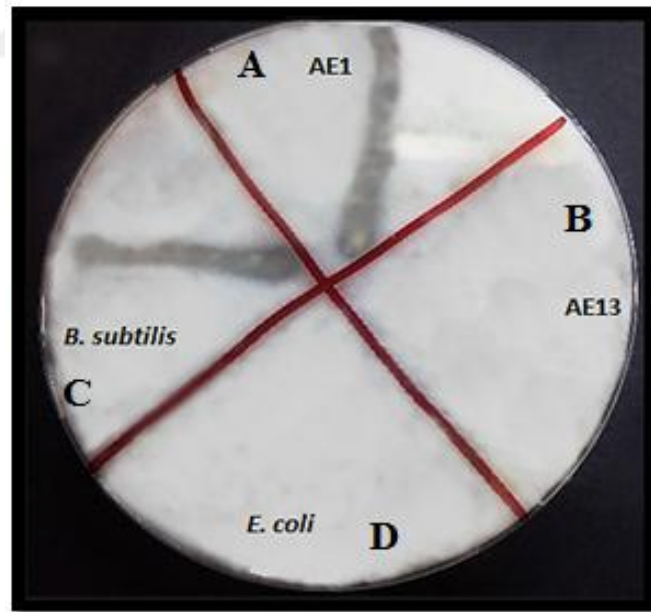
Bakteri Adı	Jelatinaz Aktivitesi
	n (%)
<i>E. faecalis</i>	42 (%91.3)
<i>E. faecium</i>	17 (89.48)
<i>E. gallinarum</i>	1 (%100)
Toplam	60 (%90.9)

n: Jelatinaz pozitif bakteri sayısı.

Çalışmada, incelenen 66 suştan 60 (%90.9)'ünün jelatinaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, 46 *E. faecalis* suşundan 4 (%8.7)'ünün (AE3, AE17, AE21 ve AE40) ve 19 *E. faecium* suşundan 2 (% 10.52)'sinin (AE50 ve AE62) jelatinaz aktivitesine sahip olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.6 ve Tablo 4.7). *E. faecalis* suşlarının daha yüksek oranda jelatinaz aktivitesi göstermesine rağmen, *E. faecalis* ve *E. faecium* arasında jelatinaz aktivitesi açısından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.2.4. Kazeinaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

24 saatlik taze Enterokok kültürleri, %3 Skim-milk Powder içeren Mueller Hinton Agar (Oxoid, UK) besiyerinde kazeinaz aktivitesi açısından incelenmiştir.



Şekil 4.6: Enterokok suşlarına ait kazeinaz aktivitesi görünümü. **A:** AE1 (kazeinaz +), **B:** AE13 (kazeinaz -), **C:** Pozitif kontrol (*Bacillus subtilis*), **D:** Negatif kontrol (*Escherichia coli*).

Enterokok suşlarına ait kazeinaz aktivitesi sonuçları Tablo 4.9'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9: Enterokok suşlarının kazeinaz aktiviteleri.

Bakteri No.	Kazeinaz Aktivitesi	Bakteri No.	Kazeinaz Aktivitesi	Bakteri No.	Kazeinaz Aktivitesi
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	-	AE46	-
AE3	+	AE25	+	AE47	-
AE4	-	AE26	+	AE48	-
AE5	+	AE27	-	AE49	+
AE6	+	AE28	-	AE50	-
AE7	+	AE29	+	AE51	-
AE8	-	AE30	-	AE52	-
AE9	+	AE31	+	AE53	-
AE10	+	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	-
AE12	+	AE34	-	AE56	+
AE13	-	AE35	-	AE57	+
AE14	+	AE36	-	AE58	-
AE15	-	AE37	+	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	-
AE17	+	AE39	-	AE61	-
AE18	+	AE40	+	AE62	-
AE19	+	AE41	-	AE63	-
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	-	AE65	-
AE22	-	AE44	+	AE66	+
				SB	+
				Negatif kontrol	-

SB: Standart bakteri.

Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının kazeinaz aktivitesine ait oranlar, Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.10: Enterokok suşlarının kazeinaz aktivitesi oranları.

Bakteri Adı	Kazeinaz Aktivitesi n (%)
<i>E. faecalis</i>	30 (%65.2)
<i>E. faecium</i>	6 (%31.5)
<i>E. gallinarum</i>	1 (%100)
Toplam	37 (%56)

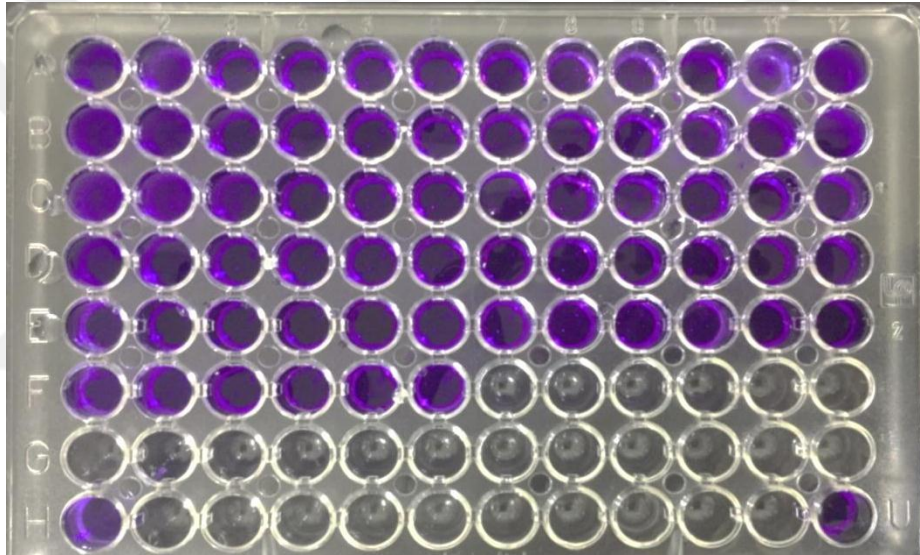
n: Kazeinaz aktivitesi pozitif bakteri sayısı.

Tablo 4.9 ve Tablo 4.10 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 30 *E. faecalis*, 6 *E. faecium* ve bir *E. gallinarum* olmak üzere toplamda 37 Enterokok suşunun kazeinaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, 16 *E. faecalis* (AE4, AE8, AE13, AE15, AE22, AE24, AE27, AE28, AE30, AE34, AE35, AE36, AE39, AE41, AE43 ve AE46) ile 13 *E. faecium* (AE47, AE48, AE50, AE51, AE52, AE53, AE55, AE58, AE60, AE61, AE62, AE63 ve AE65) olmak üzere 29 Enterokok suşunun, %3 Skim-milk Powder içeren Mueller Hinton Agar besiyerinde zon oluşturmadığı tespit edilmiş ve belirtilen suşların kazeinaz aktivitesine sahip olmadığı saptanmıştır.

Çalışma sonucunda, deniz suyundan izole edilen tüm Enterokok suşlarının değişen oranlarda kazeinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, çalışmada incelenen *E. faecalis* suşunun diğer suşlara göre daha yüksek oranda kazeinaz aktivitesine sahip olduğu ve *E. faecalis* ile *E. faecium* arasında kazeinaz aktivitesi açısından anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$)

4.2.5. Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Enterococcus bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasitelerine ait değerlendirme sonuçları Tablo 4.11 ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu, negatif kontrol olarak ise steril çeşme suyu kullanılmıştır.



Şekil 4.7: Biyofilm oluşum deneyinde kullanılan 96 kuyucuklu polistren mikropleyt. **A1-A12:** AE1-AE12; **B1-B12 sırası:** AE13-AE24; **C1-C12 sırası:** AE25-AE36; **D1-D12:** AE37-AE48; **E1-E12:** AE49-AE60; **F1-F6:** AE61-AE66; **H1:** Negatif kontrol; **H12:** Pozitif kontrol (*E.faecalis* ATCC 29212).

Tablo 4.11: Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri.

Bakteri No.	Absorbans	Biyofilm Oluşturma Kapasitesi	Bakteri No.	Absorbans	Biyofilm Oluşturma Kapasitesi
	Değerleri (OD ₅₄₀) Ortalama ±SS			Değerleri (OD ₅₄₀) Ortalama ±SS	
AE1	0.3525±0.01	Orta	AE35	0.3315±0.03	Orta
AE2	0.4450±0.01	Orta	AE36	0.4035±0.00	Orta
AE3	0.6550±0.04	Kuvvetli	AE37	0.4005±0.00	Orta
AE4	0.5355±0.01	Kuvvetli	AE38	0.4750±0.00	Orta
AE5	0.1640±0.01	Zayıf	AE39	0.4080±0.01	Orta
AE6	0.3100±0.00	Orta	AE40	0.4235±0.01	Orta
AE7	0.6010±0.03	Kuvvetli	AE41	0.3650±0.01	Orta
AE8	0.4200±0.01	Orta	AE42	0.2565±0.01	Orta
AE9	0.5175±0.01	Kuvvetli	AE43	0.5625±0.04	Kuvvetli
AE10	0.5295±0.02	Kuvvetli	AE44	0.6080±0.01	Kuvvetli
AE11	0.3840±0.01	Orta	AE45	0.4470±0.03	Orta
AE12	0.6830±0.02	Kuvvetli	AE46	0.5210±0.00	Kuvvetli
AE13	0.3685±0.01	Orta	AE47	0.4670±0.00	Orta
AE14	0.3890±0.00	Orta	AE48	0.6645±0.00	Kuvvetli
AE15	0.5550±0.02	Kuvvetli	AE49	0.5365±0.00	Kuvvetli
AE16	0.5455±0.03	Kuvvetli	AE50	0.4230±0.02	Orta
AE17	0.5170±0.02	Kuvvetli	AE51	0.6140±0.00	Kuvvetli
AE18	0.4795±0.03	Orta	AE52	0.5100±0.00	Kuvvetli
AE19	0.6535±0.00	Kuvvetli	AE53	0.5500±0.03	Kuvvetli
AE20	0.7160±0.01	Kuvvetli	AE54	0.6435±0.04	Kuvvetli
AE21	0.6390±0.00	Kuvvetli	AE55	0.4800±0.00	Orta
AE22	0.1995±0.00	Zayıf	AE56	0.6000±0.00	Orta
AE23	0.5150±0.01	Kuvvetli	AE57	0.4425±0.05	Orta
AE24	0.4760±0.00	Orta	AE58	0.3635±0.00	Orta
AE25	0.4010±0.00	Orta	AE59	0.4410±0.03	Orta
AE26	0.2580±0.05	Orta	AE60	0.4730±0.01	Orta
AE27	0.6640±0.02	Kuvvetli	AE61	0.4090±0.00	Orta
AE28	0.6990±0.02	Kuvvetli	AE62	0.4490±0.00	Orta
AE29	0.3550±0.01	Orta	AE63	0.5810±0.00	Kuvvetli
AE30	0.4485±0.06	Orta	AE64	0.5975±0.00	Kuvvetli
AE31	0.3790±0.00	Orta	AE65	0.4580±0.00	Orta
AE32	0.3645±0.01	Orta	AE66	0.4825±0.02	Orta
AE33	0.3980±0.00	Orta	SB	0.5190±0.02	Kuvvetli
AE34	0.5810±0,03	Kuvvetli	Negatif Kontrol	0.1255±0.00	-

OD: Optik dansite, SS: Standart sapma, SB: Standart bakteri.

Stepanovic ve diğ. (2000) tarafından tanımlanan kriterler dikkate alındığında, deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşundan 19 *E. faecalis* (AE3, AE4, AE7, AE9, AE10, AE12, AE15, AE16, AE17, AE19, AE20, AE21, AE23, AE27, AE28, AE34, AE43, AE44 ve AE46) ile 8 *E. faecium* (AE48, AE49, AE21, AE52, AE53, AE54, AE63 ve AE64) olmak üzere toplamda 27 (%40.90) suşun kuvvetli tutunma özelliği gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan, 25 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE6, AE8, AE11, AE13, AE14, AE18, AE24, AE25, AE26, AE29, AE30, AE31, AE32, AE33, AE35, AE36, AE37, AE38, AE39, AE40, AE41, AE42 ve AE45) ile 8 *E. faecium* (AE47, AE50, AE55, AE56, AE57, AE58, AE59, AE60, AE61, AE62 ve AE65) ve bir *E. gallinarum* (AE66) suşu olmak üzere toplamda 37 (%56.1)

örneğin orta kuvvette tutunma özelliği gösterdiği saptanmıştır. Çalışma incelenen Enterokok bakterilerinden sadece AE5 ve AE22 (*E. faecalis*) olmak üzere toplam 2 (%3) suşun zayıf tutunma özelliği gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan Enterokok bakterilerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri Tablo 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12: Enterokok suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri.

Bakteri Adı	Biyofilm Oluşturma Kapasitesi			
	Non-adherent	Zayıf	Orta	Kuvvetli
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E. faecalis</i>	0 (%0)	2 (%4.3)	25 (%54.3)	19 (%41.3)
<i>E. faecium</i>	0 (%0)	0 (%0)	11 (%57.9)	8 (%42.1)
<i>E. gallinarum</i>	0 (%0)	0 (%0)	1 (%100)	0 (%0)
Toplam	0 (%0)	2 (%3.03)	37 (%56.06)	27 (%40.9)

n: Bakteri sayısı.

Tablo 4.12 incelendiğinde, çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının tamamının zayıf, orta ya da kuvvetli şiddette biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium*’un biyofilm oluşturma oranları sırasıyla zayıf tutunma için %4.3 ve %0, orta kuvvette tutunma için %54.3 ve %57.9, kuvvetli tutunma için ise %41.3 ve %42.1 olduğu belirlenmiştir. *E. gallinarum*’un ise orta kuvvette biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun biyofilm oluşturma kapasitesi değerlendirildiğinde tüm suşların değişen oranlarda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmada *E. faecalis* ve *E. faecium* arasında, bakterilerin biyofilm oluşturma kapasitesi açısından anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.2.6. Serum Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun insan serumuna duyarlılıkları Tablo 4.13’te gösterilmiştir.

Tablo 4.13: Enterokok suşlarının serum duyarlılıkları.

Bakteri No.	Serum direnci	Bakteri No.	Serum direnci
AE1	+	AE34	-
AE2	/	AE35	+
AE3	+	AE36	+
AE4	-	AE37	+
AE5	+	AE38	+
AE6	-	AE39	-
AE7	-	AE40	+
AE8	+	AE41	-
AE9	+	AE42	-
AE10	-	AE43	+
AE11	/	AE44	-
AE12	+	AE45	+
AE13	+	AE46	-
AE14	-	AE47	/
AE15	/	AE48	-
AE16	+	AE49	-
AE17	-	AE50	+
AE18	+	AE51	-
AE19	-	AE52	+
AE20	+	AE53	-
AE21	+	AE54	/
AE22	-	AE55	+
AE23	+	AE56	+
AE24	+	AE57	+
AE25	+	AE58	-
AE26	-	AE59	+
AE27	-	AE60	/
AE28	+	AE61	/
AE29	+	AE62	-
AE30	-	AE63	/
AE31	+	AE64	-
AE32	-	AE65	-
AE33	+	AE66	-
		SB	+
		Negatif kontrol	-

+: Seruma dirençli, -: Seruma duyarlı, /: Seruma yarı-duyarlı, **SB**: Standart bakteri.

Tablo 4.13 incelendiğinde 66 Enterokok suşundan 25 *E. faecalis* (AE1, AE3, AE5, AE8, AE9, AE12, AE13, AE16, AE18, AE20, AE21, AE23-AE25, AE28, AE29, AE31, AE33, AE35-AE38, AE40, AE43, AE45) ile 6 *E. faecium* (AE50, AE52, AE55-AE57, AE59) olmak üzere toplamda 31 (%46.97) suşun seruma dirençli olduğu belirlenmiştir. 3 *E. faecalis* (AE2, AE11, AE15) ve 5 *E. faecium* (AE47, AE54, AE60, AE61, AE63) olmak üzere toplamda 8 (%12.12) suşun seruma yarı-duyarlı olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 18 (%27.27) *E. faecalis* suşu, 8 (%12.12) adet *E. faecium* suşu ve 1 (1.51) *E. gallinarum* suşu olmak üzere toplamda 27 Enterokok suşunun seruma duyarlı olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak

kullanılan *E. faecalis* ATCC 29212 bakterisinin serumun antibakteriyel etkisine dirençli olduğu saptanmıştır.

Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının serum duyarlılık oranları Tablo 4.14'te gösterilmiştir.

Tablo 4.14: Enterokok suşlarının serum duyarlılık oranları.

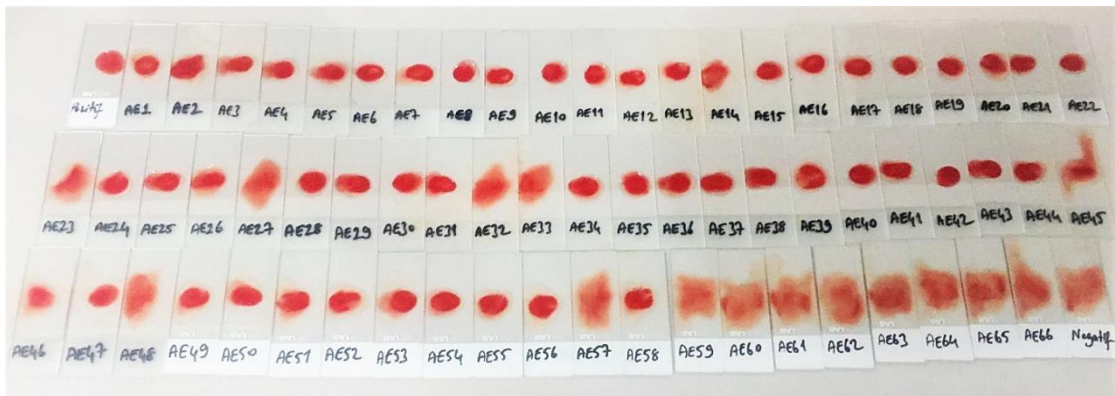
Bakteri Adı	Serum Duyarlılığı		
	Seruma dirençli	Seruma duyarlı	Seruma yarı-duyarlı
	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E. faecalis</i>	25 (%54.34)	18 (%39.13)	3 (%6.53)
<i>E. faecium</i>	6 (%31.57)	8 (%42.1)	5 (%26.31)
<i>E. gallinarum</i>	0 (%0)	1 (%100)	0 (%0)
Toplam	31 (%46.9)	27 (%40.9)	8 (%12.12)

n, Bakteri sayısı.

Tablo 4.14 incelendiğinde, çalışmada kullanılan 66 Enterokok suşundan 31 (%46.9)'i seruma dirençli, 27 (%40.9)'si seruma duyarlı ve 8 (%12.12)'i ise seruma yarı-duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda, Enterokok suşlarının seruma dirençli, duyarlı ve yarı duyarlılık oranları sırasıyla *E. faecalis* için %54.34, %39.13 ve %6.53, *E. faecium* için %31.57, %42.1 ve %26.31 olarak tespit edilmiştir. *E. gallinarum* suşunun ise insan serumuna duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda, *E. faecalis* suşlarının *E. faecium* suşlarına oranla insan serumuna dirençli olduğu görünmekle beraber aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.2.7. Hemagglütinasyon Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Enterokok suşlarının hemagglütinasyon yetenekleri, lam hemagglütinasyon testi ile incelenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.8: Enterokok suşlarının hemagglütinasyon reaksiyonları.

Enterokok suşlarına ait hemagglütinasyon aktivitesi sonuçları Tablo 4.15'te gösterilmiştir.

Tablo 4.15: Enterokok suşlarının hemagglütinasyon aktivitesi.

Bakteri No.	Hemagglütinasyon şiddeti	Bakteri No.	Hemagglütinasyon şiddeti
AE1	++++	AE34	++++
AE2	++++	AE35	+++
AE3	+++	AE36	+++
AE4	+++	AE37	+++
AE5	+++	AE38	+++
AE6	++++	AE39	++++
AE7	+++	AE40	+++
AE8	++++	AE41	+++
AE9	++++	AE42	++++
AE10	++++	AE43	+++
AE11	++++	AE44	++
AE12	++++	AE45	+
AE13	++++	AE46	+
AE14	++	AE47	++
AE15	++++	AE48	-
AE16	++++	AE49	+++
AE17	+++	AE50	++
AE18	+++	AE51	++
AE19	++++	AE52	++
AE20	++	AE53	++
AE21	+++	AE54	++
AE22	+++	AE55	++
AE23	+	AE56	++
AE24	+++	AE57	-
AE25	++	AE58	++
AE26	++	AE59	-
AE27	-	AE60	-
AE28	++++	AE61	-
AE29	+++	AE62	-
AE30	++++	AE63	-
AE31	++++	AE64	-
AE32	-	AE65	-
AE33	-	AE66	-
		SB	++++
		Negatif kontrol	-

++++: Çok kuvvetli hemagglütinasyon aktivitesi, +++: Kuvvetli hemagglütinasyon aktivitesi, ++: Zayıf hemagglütinasyon aktivitesi; +: Çok zayıf hemagglütinasyon aktivitesi, -: Hemagglütinasyon aktivitesi yok, **SB**: Standart bakteri.

Tablo 4.15 incelendiğinde, 18 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE6, AE8-13, AE15, AE16, AE19, AE28, AE30, AE31, AE34, AE39, AE42) olmak üzere suşların %27.27'sinin çok kuvvetli (++++) hemagglütinasyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bunun yanısıra, 17 *E. faecalis* (AE3-AE5, AE7, AE17, AE18, AE21, AE22, AE24, AE29, AE35-AE38, AE40, AE41, AE43) ile bir *E. faecium* (AE49) olmak üzere toplamda 18 (%27.27) suşun kuvvetli (+++) hemagglütinasyon aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. 5 *E. faecalis* (AE14, AE20, AE25, AE26,

AE44) ile 9 *E. faecium* (AE47, AE50-AE56, AE58) olmak üzere toplamda 14 (%21.21) adet suşun zayıf (++) hemagglütinasyon, 3 (%6.52) *E. faecalis* (AE23, AE45 ve AE46) suşunun çok zayıf (+) hemagglütinasyon aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, 3 *E. faecalis* (AE27, AE32 ve AE33), 9 *E. faecium* (AE48, AE57, AE59-AE65) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplamda 13 (%19.69) suşun hemagglütinasyon aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının hemagglütinasyon aktivitesi oranları Tablo 4.16’da gösterilmiştir.

Tablo 4.16: Enterokok suşlarının hemagglütinasyon aktivitesi oranları.

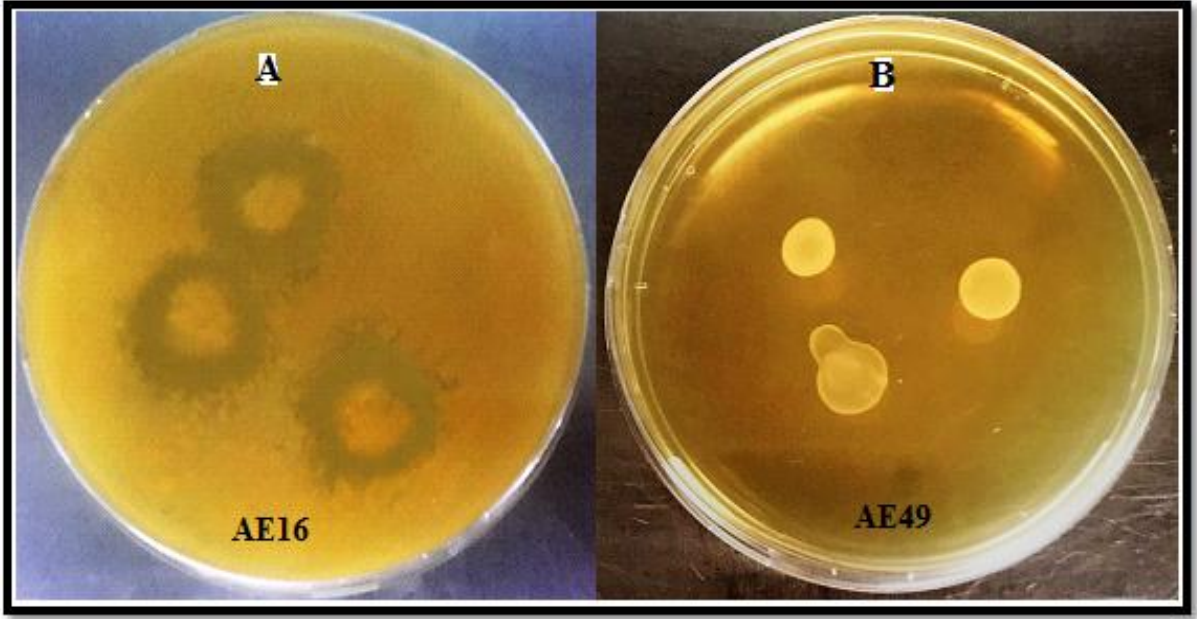
Bakteri Adı	Hemagglütinasyon aktivitesi				
	Çok kuvvetli	Kuvvetli	Zayıf	Çok zayıf	Hemag. yok
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>E. faecalis</i>	18 (%39.1)	17 (%36.9)	5 (%10.86)	3 (%6.52)	3 (%6.52)
<i>E. faecium</i>	0 (%0)	1 (%5.26)	9 (%47.36)	0 (%0)	9 (%47.36)
<i>E. gallinarum</i>	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%100)
Toplam	18 (%27.27)	18 (%27.27)	14 (%21.2)	3 (%4.54)	13 (%19.69)

n: Bakteri sayısı.

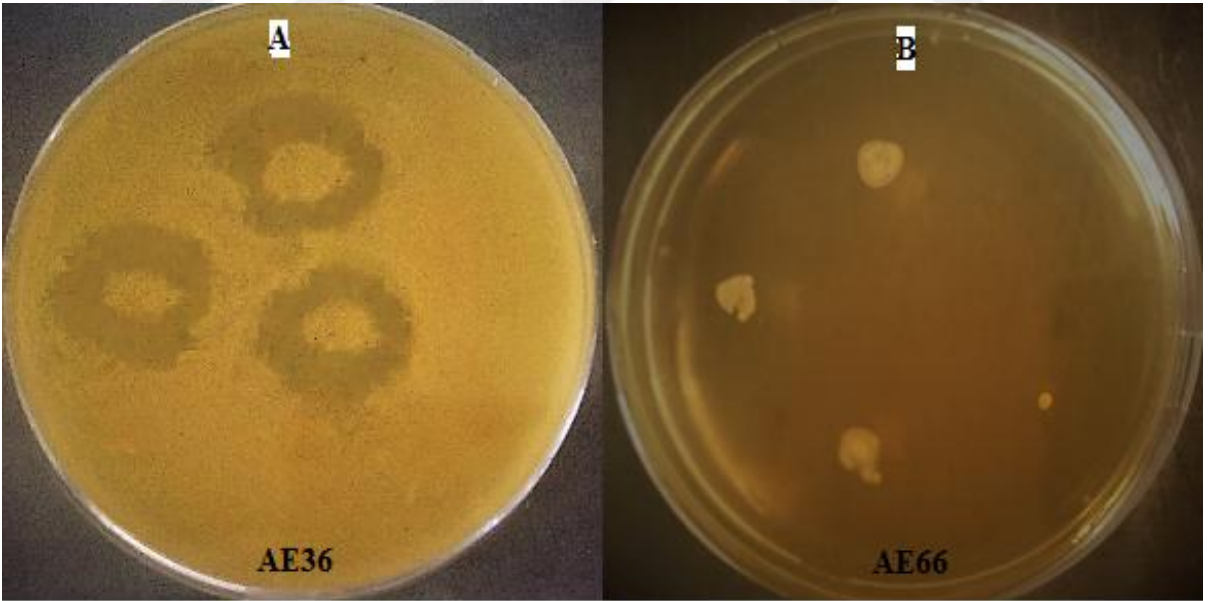
Tablo 4.16 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 18 (%27.27)’inin çok kuvvetli, 18 (%27.27)’inin kuvvetli, 14 (%21.2)’ünün zayıf, 3 (%4.54)’ünün çok zayıf hemagglütinasyon aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının hemagglütinasyon aktivitesi oranları sırasıyla, %39.1 ve %0 çok kuvvetli, %36.9 ve %5.26 kuvvetli, %10.86 ve %47.36 zayıf, %3 ve %0 çok zayıf şiddette olduğu tespit edilmiştir. *E. gallinarum* suşunun ise hemagglütinasyon aktivitesine sahip olmadığı saptanmıştır. *E. faecalis* suşlarının *E. faecium*’a göre daha yüksek oranda hemagglütinasyon aktivitesi gösterdiği ve hemagglütinasyon aktivitesi açısından aralarında anlamlı bir fark olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir.

4.2.8. Bakteriyosin Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Çalışmada, deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun indikatör olarak kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterilerine karşı bakteriyosin üretim aktivitesi incelenmiştir. M17 Agar (Himedia, India) besiyerinde 3 nokta ekim sonucunda, üreme gösteren 66 Enterokok suşunun, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Şekil 4.9) ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine (Şekil 4.10) karşı oluşturduğu zon çapı 2 mm’den büyük ise suşlar bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9: M17 Agar besiyeri üzerinde, Enterokok bakterilerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin üretme yeteneği. **A:** Bakteriyosin üretimi pozitif (zon çapı ≥ 2 mm), **B:** Bakteriyosin negatif (zon oluşumu yok).



Şekil 4.10: M17 Agar besiyeri üzerinde, Enterokok bakterilerinin *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretme yeteneği. **A:** Bakteriyosin üretimi pozitif (zon çapı ≥ 2 mm), **B:** Bakteriyosin negatif (zon oluşumu yok).

Çalışmada incelenen 66 Enterokok suşunun *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği sonuçları Tablo 4.17’de gösterilmiştir.

Tablo 4.17: Enterokok suşlarının bakteriyosin üretme yeteneği.

Bakteri No.	Zon çapı (mm)		Bakteriyosin üretme		Bakteri No.	Zon çapı (mm)		Bakteriyosin üretme	
	A	B	A	B		A	B	A	B
AE1	3.4	2.2	+	+	AE34	-	-	-	-
AE2	2.6	2.1	+	+	AE35	-	-	-	-
AE3	2.4	2.0	+	+	AE36	2.3	2.3	+	+
AE4	2.2	2.0	+	+	AE37	1.4	1.4	-	-
AE5	1.6	-	-	-	AE38	-	-	-	-
AE6	2.8	1.4	+	-	AE39	-	-	-	-
AE7	3.0	-	+	-	AE40	-	-	-	-
AE8	-	1.5	-	-	AE41	2.6	-	+	-
AE9	3.2	2.2	+	+	AE42	-	-	-	-
AE10	1.9	1.7	-	-	AE43	-	-	-	-
AE11	2.0	1.8	+	-	AE44	-	-	-	-
AE12	1.8	1.8	-	-	AE45	-	-	-	-
AE13	-	-	-	-	AE46	2.0	2.0	+	+
AE14	1.6	1.2	-	-	AE47	1.3	1.3	-	-
AE15	-	-	-	-	AE48	-	-	-	-
AE16	3.4	2.4	+	+	AE49	-	-	-	-
AE17	2.0	2.0	+	+	AE50	-	-	-	-
AE18	1.9	1.9	-	-	AE51	1.8	-	-	-
AE19	-	1.3	-	-	AE52	-	-	-	-
AE20	1.6	1.6	-	-	AE53	-	-	-	-
AE21	2.6	2.0	+	+	AE54	-	-	-	-
AE22	-	-	-	-	AE55	-	-	-	-
AE23	-	-	-	-	AE56	-	-	-	-
AE24	2.4	2.2	+	+	AE57	2.2	-	+	-
AE25	1.8	1.8	-	-	AE58	-	-	-	-
AE26	-	-	-	-	AE59	-	-	-	-
AE27	-	-	-	-	AE60	-	-	-	-
AE28	-	-	-	-	AE61	-	-	-	-
AE29	-	-	-	-	AE62	-	-	-	-
AE30	-	-	-	-	AE63	-	-	-	-
AE31	-	-	-	-	AE64	-	-	-	-
AE32	-	-	-	-	AE65	-	-	-	-
AE33	-	-	-	-	AE66	-	-	-	-
					SB	3.6	2.6	+	+

A: İndikatör bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **B:** İndikatör bakteri *E. coli* ATCC 25922, **SB:** Standart bakteri.

Tablo 4.17 incelendiğinde, deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun indikatör olarak kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı inhibitör etki gösterdiği görülmüştür. Çalışmada, Enterokok suşlarının *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı M17 Agar besiyerinde oluşturduğu zon

çapı 2 mm'den fazla olan 15 *E.faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE4, AE6, AE7, AE9, AE11, AE16, AE17, AE21, AE24, AE36, AE41 ve AE46) ile bir *E. faecium* (AE57) olmak üzere toplam 16 (%24.24) suşun bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, deniz suyundan izole edilen örneklerin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı değişen oranlarda bakteriyosin aktivitesi gösterdiği, fakat *E. faecalis* suşunun daha yüksek oranda bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Çalışmada, Enterokok suşlarının *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı M17 Agar besiyerinde oluşturduğu zon çapı 2 mm'den fazla olan 11 (%16.66) *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE4, AE9, AE16, AE17, AE21, AE24, AE36 ve AE46) suşunun bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Genel olarak diğer *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarını içeren toplam 55 (%83.34) suşun *E. coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, deniz suyundan izole edilen örneklerden sadece bazı *E. faecalis* suşlarının *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ($p<0.05$) saptanmıştır.

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarına ait bakteriyosin üretim yeteneği sonuçları Tablo 4.18'de gösterilmiştir.

Tablo 4.18: *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarına ait bakteriyosin üretme oranları.

Bakteri Adı	Bakteriyosin Üretimi	
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 n (%)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 n (%)
<i>E. faecalis</i>	15 (%32.6)	11 (%23.91)
<i>E. faecium</i>	1 (%5.26)	0 (%0)
<i>E. gallinarum</i>	0 (%0)	0 (%0)
Toplam	16 (%24.24)	11 (%16.66)

n: Pozitif bakteri sayısı.

Aynı zamanda, pozitif kontrol olarak kullanılan *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun M17 Agar besiyeri üzerinde *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 25922 bakterisine karşı sırasıyla 3.6 ve 2.6 mm zon çapı oluşturduğu ve bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.18 incelendiğinde, çalışmada incelenen 66 Enterokok suşunun 16 (%24.24)'ünün *S. aureus* ATCC 25923 bakterisine, 11 (%16.66)'inin ise *E. coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretme oranları sırasıyla *E. faecalis* için

%32.6 ve %23.91, *E. faecium* için ise %5.26 ve %0 olarak tespit edilmiştir. *E. gallinarum*'un ise bakteriyosin üretme aktivitesine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada, hem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, hem de *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretme aktivitesine sahip olan 12 suşun *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE4, AE9, AE11, AE16, AE17, AE21, AE24, AE36 ve AE46) olduğu belirlenmiştir.

4.3. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN FENOTİPİK OLARAK GENEL DEĞERLENDİRMESİ

Çalışmada kullanılan 66 Enterokok suşunun fenotipik virulans faktörlerine (β -hemoliz, jelatinaz, kazeinaz, biyofilm üretim yeteneği, serum direnci, hemagglütinasyon, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği ve antibiyotik duyarlılık) ait sonuçlar Tablo 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.19 incelendiğinde, bir *E. faecalis* (AE22) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 2 Enterokok suşunun fenotipik olarak 21 farklı virulans faktöründen en az 8 virulans faktörüne, 3 *E. faecalis* (AE16, AE21 ve AE36)'in ise fenotipik olarak en fazla 16 virulans faktörüne sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 5 Enterokok suşu 15 virulans faktörüne sahipken, Enterokok suşlarından 5'inin 14, 9'unun 13, 16'sının 12, 13'ünün 11, 6'sının 10, 4'ünün 9 virulans faktörüne sahip olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda virulans faktörleri fenotipik olarak değerlendirildiğinde, *E. faecalis* suşlarının *E. faecium*'a göre daha yüksek oranda virulans faktörüne sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.19: Enterokok suşlarında virulans faktörlerinin fenotipik olarak genel değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Fenotipik Virulans Faktörleri																				Toplam n (%)	
	Fenotipik deneyler							Antibiyotikler														
	H _β	J	K	B _K	S.D.	H _K	B _A	B _B	NA	S	P	C	VA	TE	CIP	K	AK	AM	E	CN	RIF	
AE1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	13 (%61.9)
AE2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	12 (%57.14)
AE3	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	12 (%57.14)
AE4	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	12 (%57.14)
AE5	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	12 (%57.14)
AE6	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	11 (%52.38)
AE7	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	11 (%52.38)
AE8	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	10 (%47.62)
AE9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	13 (%61.9)
AE10	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	11 (%52.38)
AE11	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	12 (%57.14)
AE12	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	12 (%57.14)
AE13	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	10 (%47.62)
AE14	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	9 (%42.85)
AE15	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	11 (%52.38)
AE16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	16 (%76.2)
AE17	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	11 (%52.38)
AE18	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	15 (%71.42)
AE19	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	14 (%66.66)
AE20	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	14 (%66.66)
AE21	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	16 (%76.2)
AE22	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	8 (%38.09)

H_β: β-hemoliz, J: Jelatinaz, K: Kazeinaz, B_K: Kuvvetli biyofilm oluşturma yeteneği, S.D.: Serum direnci, H_K: Çok kuvvetli hemaglutinasyon oluşturma yeteneği, B_A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği, B_B: *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, P: Penisilin, C: Kloramfenikol, VA: Vankomisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, K: Kanamisin, AK: Amikasin, AM: Ampisilin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, RIF: Rifampisin, n: Toplam virulans faktörü sayısı, %: Yüzde.

Tablo 4.19(devam): Enterokok suşlarında virulans faktörlerinin fenotipik olarak genel değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Fenotipik Virulans Faktörleri																			Toplam n (%)		
	Fenotipik deneyler						Antibiyotikler															
H _β	J	K	B _K	S.D.	H _K	B _A	B _B	NA	S	P	C	VA	TE	CIP	K	AK	AM	E	CN	RIF		
AE23	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	12 (%57.14)	
AE24	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE25	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	14 (%66.66)
AE26	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	11 (%52.38)
AE27	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	11 (%52.38)
AE28	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE29	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE30	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	11 (%52.38)
AE31	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	9 (%42.85)
AE32	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	9 (%42.85)
AE33	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	11 (%52.38)
AE34	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE35	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE36	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	16 (%76.2)
AE37	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE38	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	15 (%71.42)
AE39	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (%47.62)
AE40	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (%47.62)
AE41	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	12 (%57.14)
AE42	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE43	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	14 (%66.66)
AE44	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	11 (%52.38)

H_β: β-hemoliz, J: Jelatinaz, K: Kazeinaz, B_K: Kuvvetli biyofilm oluşturma yeteneği, S.D.: Serum direnci, H_K: Çok kuvvetli hemaglutinasyon oluşturma yeteneği, B_A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği, B_B: *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, P: Penisilin, C: Kloramfenikol, VA: Vankomisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, K: Kanamisin, AK: Amikasin, AM: Ampisilin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, RIF: Rifampisin, n: Toplam virulans faktörü sayısı, %: Yüzde.

Tablo 4.19(devam): Enterokok suşlarında virulans faktörlerinin fenotipik olarak genel değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Fenotipik Virulans Faktörleri																			Toplam n (%)		
	Fenotipik deneyler									Antibiyotikler												
	H _β	J	K	B _K	S.D.	H _K	B _A	B _B	NA	S	P	C	VA	TE	CIP	K	AK	AM	E	CN	RIF	
AE45	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	12 (%57.14)
AE46	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	12 (%57.14)
AE47	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	10 (%47.62)
AE48	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	10 (%47.62)
AE49	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	11 (%52.38)
AE50	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15 (%71.42)
AE51	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	12 (%57.14)
AE52	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	14 (%66.66)
AE53	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	11 (%52.38)
AE54	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	13 (%61.9)
AE55	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	12 (%57.14)
AE56	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	13 (%61.9)
AE57	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	15 (%71.42)
AE58	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	13 (%61.9)
AE59	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	11 (%52.38)
AE60	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	15 (%71.42)
AE61	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	12 (%57.14)
AE62	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	9 (%42.85)
AE63	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12 (%57.14)
AE64	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	12 (%57.14)
AE65	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	12 (%57.14)
AE66	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	8 (%38.09)

H_β: β-hemoliz, J: Jelatinaz, K: Kazeinaz, B_K: Kuvvetli biyofilm oluşturma yeteneği, S.D.: Serum direnci, H_K: Çok kuvvetli hemaglutinasyon oluşturma yeteneği, B_A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği, B_B: *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği, NA: Nalidiksik asit, S: Streptomisin, P: Penisilin, C: Kloramfenikol, VA: Vankomisin, TE: Tetrasiklin, CIP: Siprofloksasin, K: Kanamisin, AK: Amikasin, AM: Ampisilin, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, RIF: Rifampisin, n: Toplam virulans faktörü sayısı, %: Yüzde.

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerine ait fenotipik virulans faktörlerinin bulunma sıklığı Tablo 4.20'de gösterilmiştir.

Tablo 4.20: Enterokok suşlarında virulans faktörlerinin fenotipik dağılım sıklığı.

Fenotipik Virulans Faktörü	Bulunma Sıklığı (%)				
	<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	Toplam n (%)	
Fenotipik Özellikler	H _β	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
	J	42 (%91.3)	18 (%94.7)	1 (%100)	61 (%92.42)
	K	31 (%67.4)	6 (%31.57)	0 (%0)	37 (%56.06)
	B _K	19 (%41.3)	9 (%47.36)	0 (%0)	28 (%42.42)
	S.D.	24 (%52.7)	6 (%31.57)	0 (%0)	30 (%45.45)
	H _K	15 (%32.6)	0 (%0)	0 (%0)	15 (%22.72)
	B _A	15 (%32.6)	1 (%5.26)	0 (%0)	16 (%24.24)
	B _B	11 (%23.4)	0 (%0)	0 (%0)	11 (%16.66)
Antibiyotikler	NA	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
	S	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
	P	28 (%60.8)	16 (%84.2)	0 (%0)	44 (%66.66)
	C	5 (%10.86)	6 (%31.57)	0 (%0)	11 (%16.66)
	VA	19 (%41.3)	11 (%57.9)	0 (%0)	30 (%45.45)
	TE	24 (%52.7)	12 (%63.15)	0 (%0)	36 (%54.54)
	CIP	8 (%17.4)	7 (%36.84)	0 (%0)	15 (%22.72)
	K	45 (%97.82)	18 (%94.7)	0 (%0)	63 (%95.45)
	AK	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
	AM	18 (%39.13)	11 (%57.9)	1 (%100)	30 (%45.45)
	E	23 (%50)	16 (%84.2)	1 (%100)	40 (%60.6)
	CN	46 (%100)	18 (%94.7)	1 (%100)	65 (%98.48)
RIF	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)	

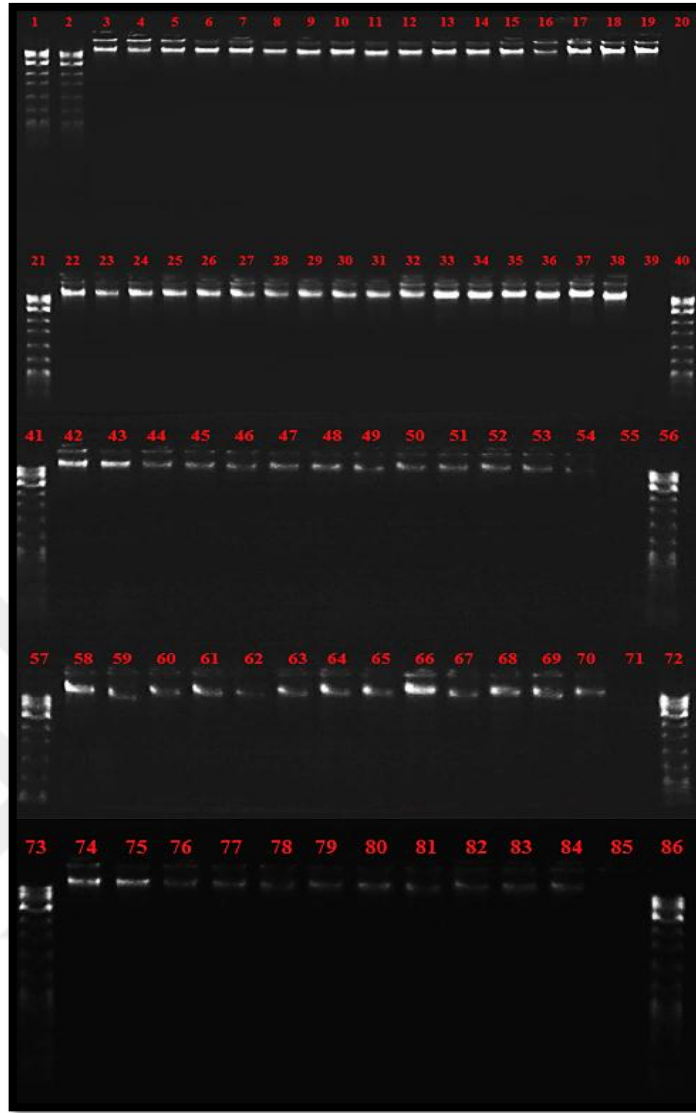
H_β: β-hemoliz; J: Jelatinaz; K: Kazeinaz; B_K: Kuvvetli biyofilm oluşturma yeteneği; S.D.: Serum direnci; H_K: Çok kuvvetli hemagglütinasyon oluşturma yeteneği; B_A: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği; B_B: *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı bakteriyosin üretim yeteneği; NA: Nalidiksik asit; S: Streptomisin; P: Penisilin; C: Kloramfenikol; VA: Vankomisin; TE: Tetrasiklin; CIP: Siprofloksasin; K: Kanamisin; AK: Amikasin; AM: Ampisilin; E: Eritromisin; CN: Gentamisin; RIF: Rifampisin; n: Toplam bakteri sayısı; %: Yüzde.

Tablo 4.20'de, incelenen 66 Enterokok suşunun tamamının (%100) β-hemoliz aktivitesi gösterdiği, nalidiksik asit, amikasin ve rifampisine dirençli olduğu ve streptomisine karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. *E. gallinarum* suşunun ise 21 farklı virulans faktöründen sadece β-hemoliz ve jelatinaz aktivitesine sahip olduğu ve nalidiksik asit, amikasin, ampisilin, eritromisin, gentamisin ve rifampisin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu saptanmıştır.

4.4. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN GENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ

4.4.1. DNA Eldesi

Çalışmada, deniz suyundan izole edilmiş ve API[®]20 Strep kiti ile tür tanımlaması yapılmış Enterokok bakterilerinin virulanslarını belirleyen genler, PZR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu bağlamda, Enterokok bakterilerinin IDPURE[™] Universal Spin Column Genomic DNA Mini Kit (IDLabs[™], Canada) kullanılarak kromozomal DNA izolasyonu ve , SpinKlean Plasmid DNA Miniprep Kit kullanılarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Enterokok suşlarına ait kromozomal ve plazmit DNA örneklerinin nitel olarak incelenmesi yatay agaroz jel elektroforezi (Clever Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. Kameralı jel görüntüleme sistemi (Daihan, Wisedoc) ile gözlemlenen kromozomal DNA'ya ait bant görüntüleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: Enterokok suşlarına ait kromozomal DNA'ların elektroforez görüntüleri. **1, 2, 21, 40, 41, 56, 73 ve 86:** 1kb plus DNA Ladder; **3, 22, 42, 58 ve 74:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **4-19, 29-38, 43-54, 59-60:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **61-83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **20, 39, 55, 71 ve 85:** Negatif kontrol.

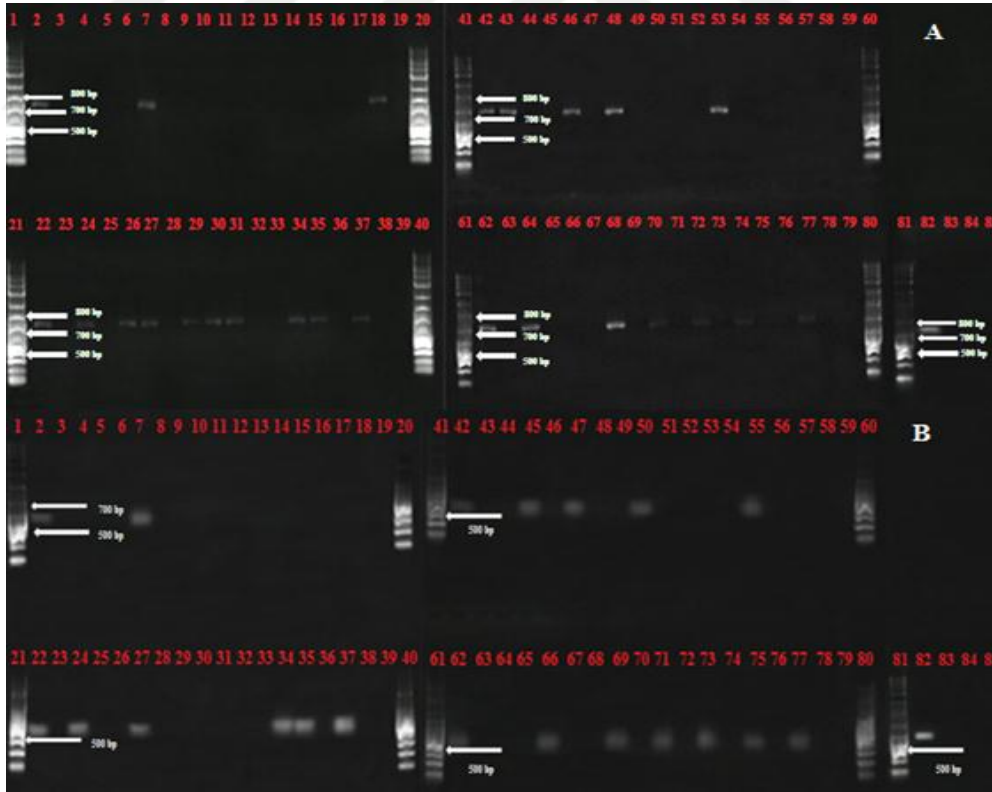
4.4.2. Antibiyotik Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Gösterilmesi

Çalışmada kullanılan Enterokok suşlarının antibiyotik direnç genlerinin PZR yöntemi ile incelenmesinde; vankomisin antibiyotiği için *vanA* (732 bp) ve *vanB* (635 bp) genlerini (Şekil 4.12) incelemede 100 bp DNA Marker (Biomatik, Canada), streptomisin antibiyotiği için *ant(6)-la* (577 bp) geni (Şekil 4.13), gentamisin antibiyotiği için *acc(6')-aph(2'')* (675 bp) geni (Şekil 4.14), kanamisin antibiyotiği için *aphA-3* (292 bp) geni (Şekil 4.15), rifampisin antibiyotiği için *rpoB1* ve *rpoB2* (1000 bp) genleri (Şekil 4.16), ampicilin antibiyotiği için *bla(Z)* (778 bp) geni (Şekil 4.17), eritromisin antibiyotiği için *ermB* (421 bp) geni (Şekil

4.18), kloramfenikol antibiyotiği için *catIP* (486 bp) geni (Şekil 4.19) ve tetrasiklin antibiyotiği için *tetM* (657 bp) ve *tetL* (457 bp) genlerini (Şekil 4.20) incelemede 50 bp DNA Marker (Sigma, US) kullanılmıştır. DNA bantlarının agaroz jel üzerindeki göçünü belirlemede %1'lik agaroz ve marker olarak 1kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific™, Generuler) kullanılmıştır. Her bir agaroz jel tankında, pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşuna ait kromozomal DNA, negatif kontrol olarak ise ultra saf su kullanılmıştır. Her bir örneğe ait kromozomal DNA örnekleri, 40 kuyucuklu yatay agaroz jel elektroforezindeki jel tankı kuyucuklarına yüklenmek üzere, 110 V'da 60 dakika karanlık ortamda yürütülmüştür. Süre sonunda DNA bantları, kameralı jel görüntüleme sistemi (Daihan, Wisedoc) ile gözlemlenmiştir.

4.4.2.1. Vankomisin Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun vankomisin antibiyotik direnç geni olan 732 bp uzunluğundaki *vanA* ve 635 bp uzunluğundaki *vanB* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.12 ve Tablo 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12: Enterokok suşlarının vankomisin direnç genlerine (*vanA* ve *vanB*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 100 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol. **A:** *vanA*; **B:** *vanB*.

Tablo 4.21: Enterokok suşlarında vankomisin direnç genlerinin (*vanA* ve *vanB*) PZR ile gösterilmesi.

Bakteri No.	Vankomisin Direnç Genleri		Bakteri No.	Vankomisin Direnç Genleri		Bakteri No.	Vankomisin Direnç Genleri	
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>		<i>vanA</i>	<i>vanB</i>		<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
AE1	-	-	AE23	+	-	AE45	-	+
AE2	-	-	AE24	+	-	AE46	-	-
AE3	-	-	AE25	+	-	AE47	-	-
AE4	-	-	AE26	-	-	AE48	-	-
AE5	+	+	AE27	-	-	AE49	-	-
AE6	-	-	AE28	+	+	AE50	+	-
AE7	-	-	AE29	+	+	AE51	-	-
AE8	-	-	AE30	-	-	AE52	-	+
AE9	-	-	AE31	+	+	AE53	-	-
AE10	-	-	AE32	-	-	AE54	+	-
AE11	-	-	AE33	+	-	AE55	-	+
AE12	-	-	AE34	-	-	AE56	+	-
AE13	-	-	AE35	-	+	AE57	-	+
AE14	-	-	AE36	+	-	AE58	+	-
AE15	-	-	AE37	-	+	AE59	-	+
AE16	+	-	AE38	+	-	AE60	+	-
AE17	-	-	AE39	-	-	AE61	-	+
AE18	+	+	AE40	-	+	AE62	-	-
AE19	-	-	AE41	-	-	AE63	+	+
AE20	+	-	AE42	-	-	AE64	-	-
AE21	+	+	AE43	+	-	AE65	-	-
AE22	-	-	AE44	-	-	AE66	-	-
						SB	+	+

SB: Standart bakteri.

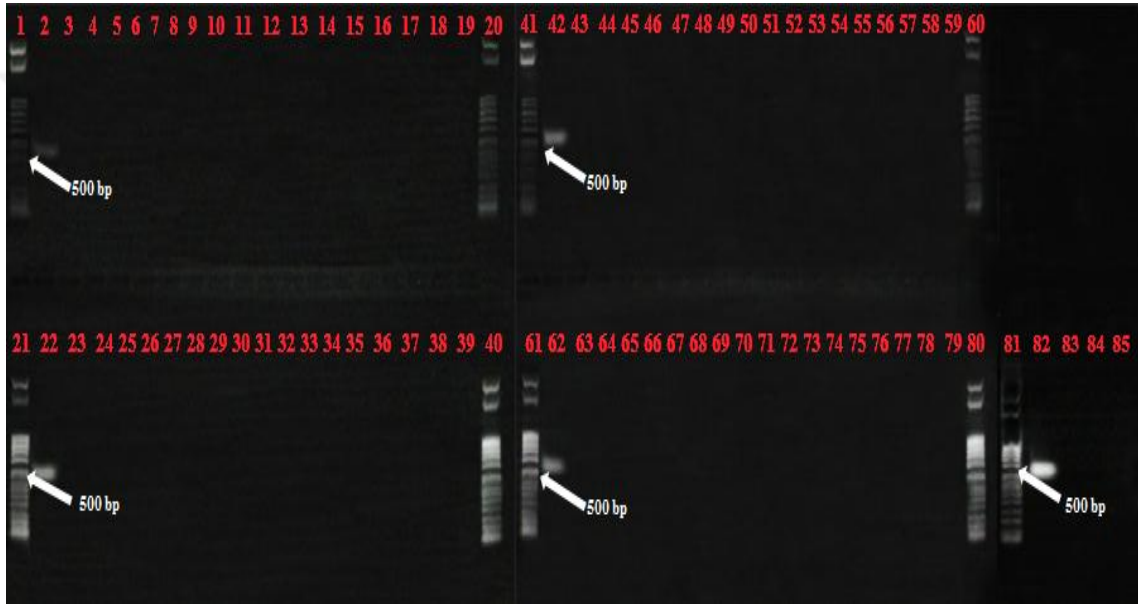
Tablo 4.21 incelendiğinde, çalışmada kullanılan 66 Enterokok suşundan 15 *E. faecalis* (%22.72) (AE5, AE16, AE18, AE20, AE21, AE23, AE24, AE25, AE28, AE29, AE31, AE33, AE36, AE38, AE43) ile 6 *E. faecium* (%9.09) (AE50, AE54, AE56, AE58, AE60 ve AE63) olmak üzere toplam 21 (%31.82) suşun *vanA* genine sahip olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarını içeren toplam 45 (%68.18) suşun *vanA* genine sahip olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4.21’de, çalışmada kullanılan 66 Enterokok suşundan 10 *E. faecalis* (%15.15) (AE5, AE18, AE21, AE28, AE29, AE31, AE35, AE37, AE40 ve AE45) ile 6 *E. faecium* (%9.09) (AE52, AE55, AE57, AE59, AE61 ve AE63) olmak üzere toplam 16 (%24.24) suşun *vanB* genine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarını içeren toplam 50 (%75.75) suşun ise vankomisin antibiyotikine karşı direnci belirten *vanB* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. Deniz suyundan izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşundan 7 (%10.6)’sinin (AE5, AE18, AE21, AE28, AE29, AE31 ve AE63) *vanA* ve *vanB* genlerine

sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, *E. faecalis* sışlarının *E. faecium*'a göre vankomisin ve linkezoid antibiyotik direnç geni olan *vanA* ve vankomisin direnç geni olan *vanB* genine daha yüksek oranda sahip olduğu ancak aralarında anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.4.2.2. Streptomisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun streptomisin antibiyotik direnç geni olan 577 bp uzunluğundaki *ant(6)-Ia* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.16 ve Tablo 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13: Enterokok suşlarının streptomisin direnç genine (*ant(6)-Ia*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.22: Enterokok suşlarında streptomisin direnç geninin (*ant(6)-la*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

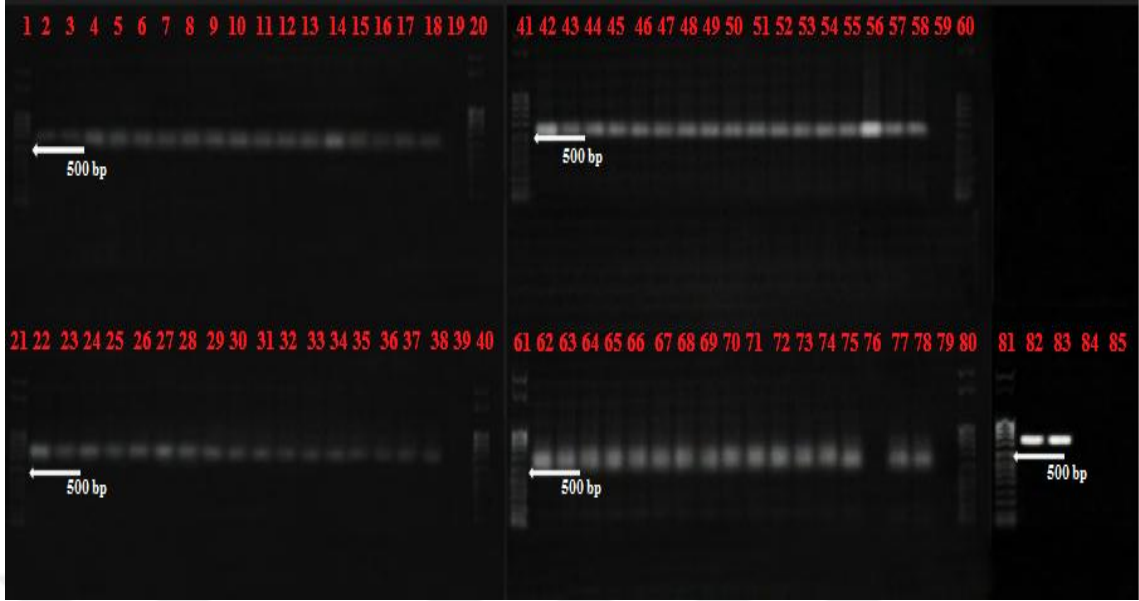
Bakteri No.	Streptomisin direnç geni <i>ant(6)-la</i>	Bakteri No.	Streptomisin direnç geni <i>ant(6)-la</i>	Bakteri No.	Streptomisin direnç geni <i>ant(6)-la</i>
AE1	-	AE23	-	AE45	-
AE2	-	AE24	-	AE46	-
AE3	-	AE25	-	AE47	-
AE4	-	AE26	-	AE48	-
AE5	-	AE27	-	AE49	-
AE6	-	AE28	-	AE50	-
AE7	-	AE29	-	AE51	-
AE8	-	AE30	-	AE52	-
AE9	-	AE31	-	AE53	-
AE10	-	AE32	-	AE54	-
AE11	-	AE33	-	AE55	-
AE12	-	AE34	-	AE56	-
AE13	-	AE35	-	AE57	-
AE14	-	AE36	-	AE58	-
AE15	-	AE37	-	AE59	-
AE16	-	AE38	-	AE60	-
AE17	-	AE39	-	AE61	-
AE18	-	AE40	-	AE62	-
AE19	-	AE41	-	AE63	-
AE20	-	AE42	-	AE64	-
AE21	-	AE43	-	AE65	-
AE22	-	AE44	-	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.13 ve Tablo 4.22 incelendiğinde *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarını içeren 66 Enterokok suşundan hiçbirinin streptomisin antibiyotikine karşı direnci belirten *ant(6)-la* genine sahip olmadığı belirlenmiştir.

4.4.2.3. Gentamisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun gentamisin antibiyotik direnç geni olan 675 bp uzunluğundaki *acc(6')-aph(2'')* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.14 ve Tablo 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14: Enterokok suşlarının gentamisin direnç genine (*acc(6')-aph(2'')*) ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.23: Enterokok suşlarında gentamisin direnç geninin (*acc(6')-aph(2'')*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

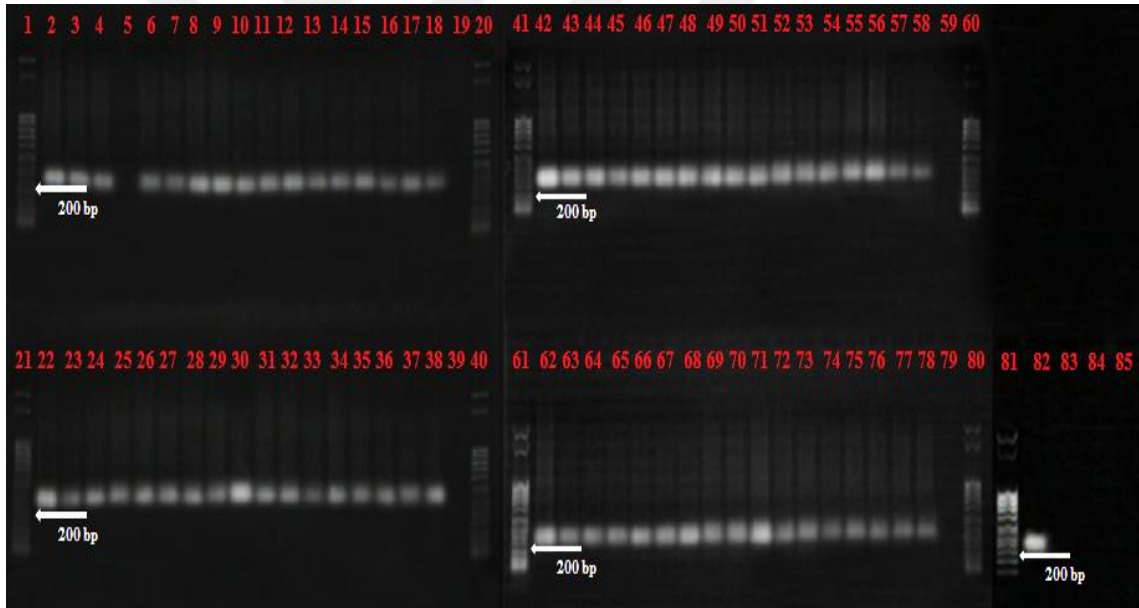
Bakteri No.	Gentamisin direnç geni <i>acc(6')-aph(2'')</i>	Bakteri No.	Gentamisin direnç geni <i>acc(6')-aph(2'')</i>	Bakteri No.	Gentamisin direnç geni <i>acc(6')-aph(2'')</i>
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	+	AE25	+	AE47	+
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	+	AE27	+	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	+
AE7	+	AE29	+	AE51	+
AE8	+	AE30	+	AE52	+
AE9	+	AE31	+	AE53	+
AE10	+	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	+	AE56	+
AE13	+	AE35	+	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	+
AE15	+	AE37	+	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	+	AE39	+	AE61	+
AE18	+	AE40	+	AE62	-
AE19	+	AE41	+	AE63	+
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	+	AE65	+
AE22	+	AE44	+	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.14 ve Tablo 4.23 incelendiğinde 49 *E. faecalis* (%74.24) (AE1-AE49) ile 15 *E. faecium* (22.72) (AE50-AE61, AE63, AE64 ve AE65) suşu olmak üzere toplam 64 (%96.96) suşun gentamisin antibiyotiğine karşı direnci kodlayan *acc(6')-aph(2'')* genine sahip olduğu belirlenmiştir 66 Enterokok suşundan bir *E. faecium* (AE62) ile bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 2 (%3.03) suşun *acc(6')-aph(2'')* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *E. faecalis* suşunun *E. faecium* suşuna göre gentamisin direnç geni (*acc(6')-aph(2'')*) daha yüksek oranda olmasına karşın anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

4.4.2.4. Kanamisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun kanamisin antibiyotik direnç geni olan 292 bp uzunluğundaki *aphA-3* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.15 ve Tablo 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15: Enterokok suşlarının kanamisin direnç genine (*aphA-3*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.24: Enterokok suşlarında kanamisin direnç geninin (*aphA-3*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

Bakteri No.	Kanamisin direnç geni <i>aphA-3</i>	Bakteri No.	Kanamisin direnç geni <i>aphA-3</i>	Bakteri No.	Kanamisin direnç geni <i>aphA-3</i>
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	-	AE25	+	AE47	+
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	+	AE27	+	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	+
AE7	+	AE29	+	AE51	+
AE8	+	AE30	+	AE52	+
AE9	+	AE31	+	AE53	+
AE10	+	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	+	AE56	+
AE13	+	AE35	+	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	+
AE15	+	AE37	+	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	+	AE39	+	AE61	+
AE18	+	AE40	+	AE62	-
AE19	+	AE41	+	AE63	+
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	+	AE65	-
AE22	+	AE44	+	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.15 ve Tablo 4.24 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 63 (%95.46) suşun kanamisin antibiyotik direnci kodlayan *aphA-3* genine sahip olduğu, diğer bir *E. faecalis* (AE3) ile 2 *E. faecium* (AE62 ve AE65) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 4 suşun ise *aphA-3* genine sahip olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

4.4.2.5. Rifampisin Antibiyotik Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun rifampisin antibiyotik direnç geni olan 1000 bp uzunluğundaki *rpoB1* ve *rpoB2* genleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.16 ve Tablo 4.25'te gösterilmiştir.



Şekil 4.16: Enterokok suşlarının rifampisin direnç genlerine (*rpoB1* ve *rpoB2*) ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol; **A:** *rpoB1*; **B:** *rpoB2*.

Tablo 4.25: Enterokok suşlarında rifampisin direnç genlerinin (*rpoB1* ve *rpoB2*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

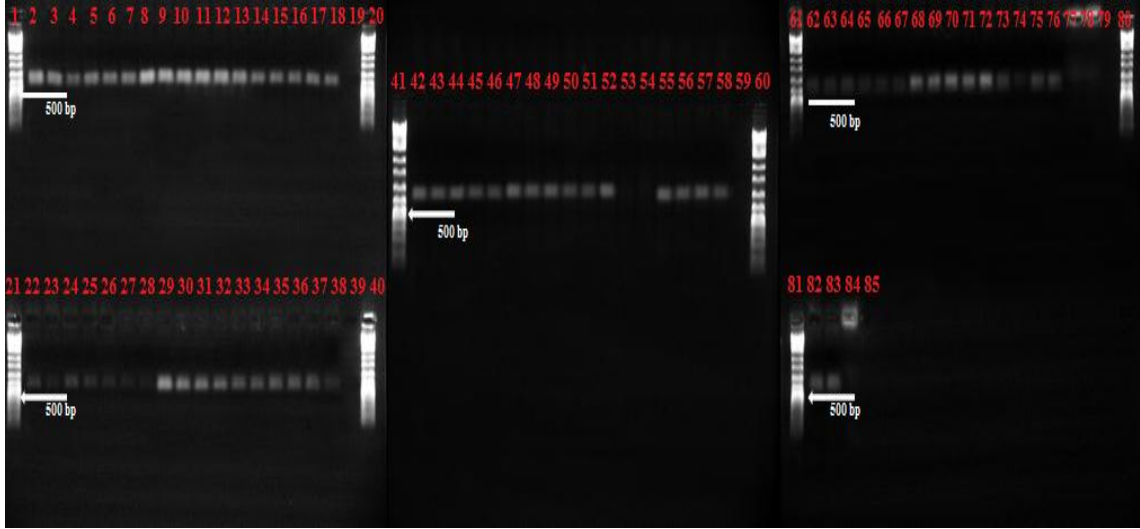
Bakteri No.	Rifampisin Direnç Geni		Bakteri No.	Rifampisin Direnç Geni		Bakteri No.	Rifampisin Direnç Geni	
	<i>rpoB1</i>	<i>rpoB2</i>		<i>rpoB1</i>	<i>rpoB2</i>		<i>rpoB1</i>	<i>rpoB2</i>
AE1	+	+	AE23	+	+	AE45	+	+
AE2	+	+	AE24	+	+	AE46	+	+
AE3	+	+	AE25	+	+	AE47	+	+
AE4	+	+	AE26	+	+	AE48	+	+
AE5	+	+	AE27	+	+	AE49	+	+
AE6	+	+	AE28	+	+	AE50	+	-
AE7	+	+	AE29	+	+	AE51	+	+
AE8	+	+	AE30	+	+	AE52	+	+
AE9	+	+	AE31	+	+	AE53	+	+
AE10	+	+	AE32	+	+	AE54	+	+
AE11	+	+	AE33	+	+	AE55	+	+
AE12	+	+	AE34	+	+	AE56	+	+
AE13	+	+	AE35	+	+	AE57	+	+
AE14	+	+	AE36	+	+	AE58	+	+
AE15	+	+	AE37	+	+	AE59	+	+
AE16	+	+	AE38	+	+	AE60	+	+
AE17	+	+	AE39	+	+	AE61	+	+
AE18	+	+	AE40	+	-	AE62	+	+
AE19	+	+	AE41	+	+	AE63	+	+
AE20	+	+	AE42	+	+	AE64	+	+
AE21	+	+	AE43	+	+	AE65	+	+
AE22	+	+	AE44	+	+	AE66	+	+
						SB	+	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.16 ve Tablo 4.25 incelendiğinde, *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun tamamının (%100) *rpoB1* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, bir (%1.51) *E. faecalis* (AE40) dışında kalan 65 örneğin tamamının (%98.48) *rpoB2* genine sahip olduğu ve *E. faecalis* ile *E. faecium* arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

4.4.2.6. Ampisilin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun ampisilin antibiyotik direnç geni olan 778 bp uzunluğundaki *bla(Z)* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.17 ve Tablo 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.17: Enterokok suşlarının ampisilin direnç genine (*bla(Z)*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.26: Enterokok suşlarında ampisilin direnç geninin (*bla(Z)*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

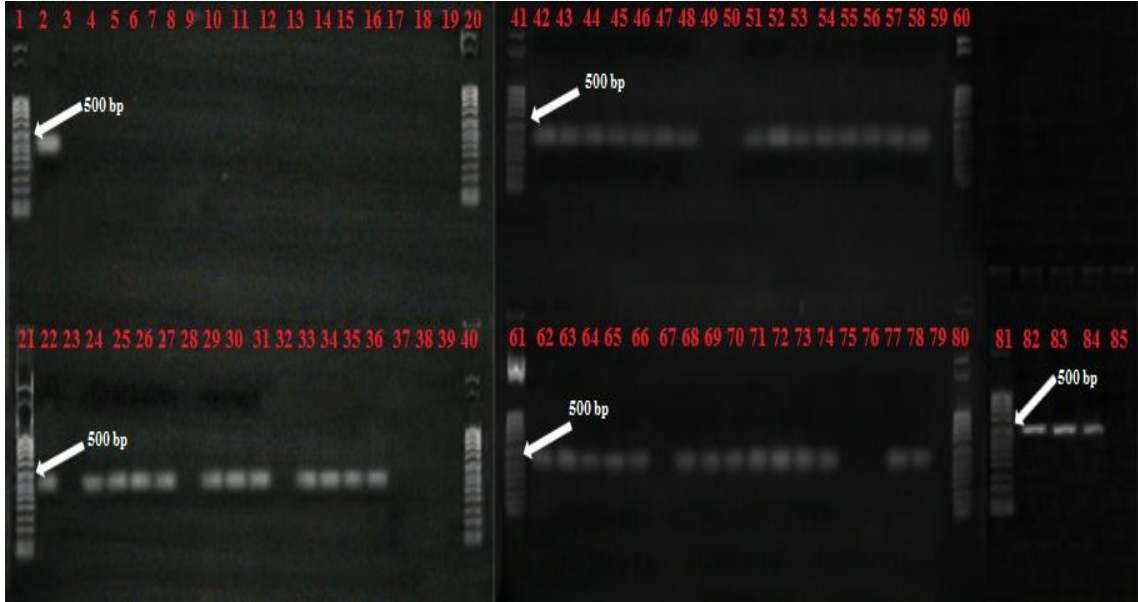
Bakteri No.	Ampisilin direnç geni <i>bla(Z)</i>	Bakteri No.	Ampisilin direnç geni <i>bla(Z)</i>	Bakteri No.	Ampisilin direnç geni <i>bla(Z)</i>
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	+	AE25	+	AE47	+
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	+	AE27	+	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	+
AE7	+	AE29	+	AE51	+
AE8	+	AE30	+	AE52	+
AE9	+	AE31	+	AE53	+
AE10	+	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	+	AE56	+
AE13	+	AE35	+	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	+
AE15	+	AE37	+	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	+	AE39	+	AE61	+
AE18	+	AE40	-	AE62	+
AE19	+	AE41	+	AE63	-
AE20	+	AE42	+	AE64	-
AE21	+	AE43	-	AE65	+
AE22	+	AE44	-	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.17 ve Tablo 4.26 incelendiğinde çalışmada kullanılan *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini de içeren 66 Enterokok suşundan 3 *E. faecalis* (AE40, AE43 ve AE44) ile 2 *E. faecium* (AE63 ve AE64) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 6 (%9.1) suşun dışında kalan toplam 60 Enterokok suşunun (%90.90) *bla(Z)* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. *E. faecalis* suşunun *E. faecium* suşuna göre ampisilin direnç geni (*bla(Z)*) daha yüksek oranda bulunmasına karşın aralarında anlamlı bir fark olmadığı sptanmıştır ($p>0.05$).

4.4.2.7. Eritromisin Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun eritromisin antibiyotik direnç geni olan 421 bp uzunluğundaki *ermB* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.18 ve Tablo 4.27’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18: Enterokok suşlarının eritromisin direnç genine (*ermB*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.27: Enterokok suşlarında eritromisin direnç geninin (*ermB*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

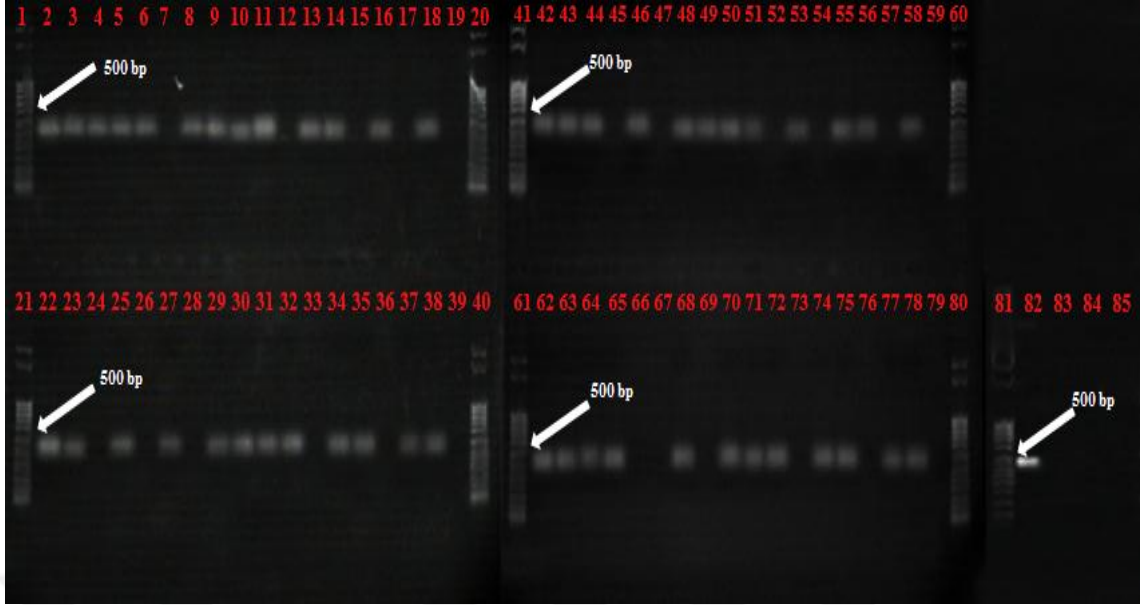
Bakteri No.	Eritromisin direnç geni <i>ermB</i>	Bakteri No.	Eritromisin direnç geni <i>ermB</i>	Bakteri No.	Eritromisin direnç geni <i>ermB</i>
AE1	-	AE23	+	AE45	+
AE2	-	AE24	+	AE46	+
AE3	-	AE25	+	AE47	+
AE4	-	AE26	-	AE48	+
AE5	-	AE27	+	AE49	+
AE6	-	AE28	+	AE50	+
AE7	-	AE29	+	AE51	+
AE8	-	AE30	+	AE52	+
AE9	-	AE31	-	AE53	-
AE10	-	AE32	-	AE54	+
AE11	-	AE33	+	AE55	+
AE12	-	AE34	+	AE56	+
AE13	-	AE35	+	AE57	+
AE14	-	AE36	+	AE58	+
AE15	-	AE37	+	AE59	+
AE16	-	AE38	+	AE60	+
AE17	-	AE39	-	AE61	-
AE18	+	AE40	-	AE62	-
AE19	+	AE41	+	AE63	+
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	+	AE65	+
AE22	-	AE44	+	AE66	+
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.18 ve Tablo 4.27 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 23 *E. faecalis* (AE18, AE19, AE20, AE21, AE23, AE24, AE25, AE27, AE28, AE29, AE30, AE33, AE34, AE35, AE36, AE37, AE38, AE41, AE42, AE43, AE44, AE45 ve AE46) ile 16 *E. faecium* (AE47, AE48, AE49, AE50, AE51, AE52, AE54, AE55, AE56, AE57, AE58, AE59, AE60, AE63, AE64 ve AE65) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 40 (%60.6) suşun *ermB* genine sahip olduğu, kalan 26 (%39.4) suşun ise *ermB* genine sahip olmadığı saptanmıştır. *E. faecalis* suşunun *E. faecium* suşuna oranla daha yüksek oran eritromisin direnç genine (*ermB*) sahip olduğu, aralarında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

4.4.2.8. Kloramfenikol Antibiyotik Direnç Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun kloramfenikol antibiyotik direnç geni olan 486 bp uzunluğundaki *catpIP* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.19 ve Tablo 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19: Enterokok suşlarının kloramfenikol direnç genine (*catpIP*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.28: Enterokok suşlarında kloramfenikol direnç geninin (*catpIP*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

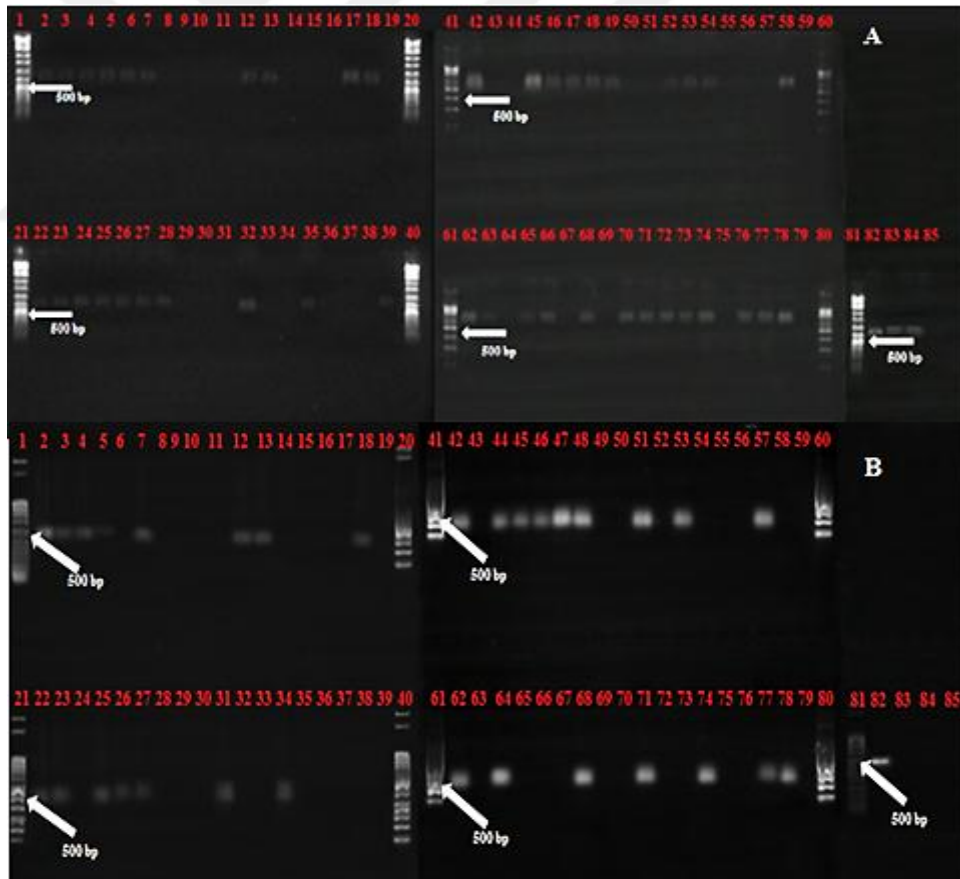
Bakteri No.	Kloramfenikol direnç geni <i>catpIP</i>	Bakteri No.	Kloramfenikol direnç geni <i>catpIP</i>	Bakteri No.	Kloramfenikol direnç geni <i>catpIP</i>
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	+	AE25	+	AE47	-
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	-	AE27	-	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	+
AE7	+	AE29	+	AE51	+
AE8	+	AE30	-	AE52	-
AE9	+	AE31	+	AE53	-
AE10	-	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	-
AE12	+	AE34	+	AE56	+
AE13	-	AE35	-	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	+
AE15	-	AE37	-	AE59	-
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	+	AE39	+	AE61	+
AE18	-	AE40	+	AE62	-
AE19	+	AE41	+	AE63	+
AE20	-	AE42	-	AE64	+
AE21	+	AE43	+	AE65	-
AE22	-	AE44	-	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.19 ve Tablo 4.28 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 33 *E. faecalis* ve 12 *E. faecium* suşu olmak üzere toplam 45 (%68.18) suşun kloramfenikol direnç genini kodlayan *catpIP* genine sahip olduğu, 13 *E. faecalis* (AE5, AE10, AE13, AE15, AE18, AE20, AE22, AE27, AE30, AE35, AE37, AE42 ve AE44) ile 7 *E. faecium* (AE47, AE52, AE53, AE55, AE59, AE62 ve AE65) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 21 (%31.82) örneğin ise *catpIP* genine sahip olmadığı saptanmıştır. Kloramfenikol direnç genini (*catpIP*) *E. faecalis* suşlarında *E. faecium* suşlarına göre daha yüksek oranda bulunmasına karşın aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.4.2.9. Tetrasiklin Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun tetrasiklin antibiyotik direnç geni olan 657 bp uzunluğundaki *tetM* ve 457 bp uzunluğundaki *tetL* genleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20 ve Tablo 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.20: Enterokok suşlarının tetrasiklin direnç genlerine (*tetM* ve *tetL*) ait PZR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol; **A:** *tetM*; **B:** *tetL*.

Tablo 4.29: Enterokok suşlarında tetrasiklin direnç genlerinin (*tetM* ve *tetL*) PZR yöntemi ile gösterilmesi.

Bakteri No.	Tetrasiklin direnç geni		Bakteri No.	Tetrasiklin direnç geni		Bakteri No.	Tetrasiklin direnç geni	
	<i>tetM</i>	<i>tetL</i>		<i>tetM</i>	<i>tetL</i>		<i>tetM</i>	<i>tetL</i>
AE1	+	+	AE23	-	-	AE45	-	-
AE2	+	+	AE24	-	-	AE46	-	-
AE3	+	+	AE25	-	+	AE47	-	+
AE4	+	-	AE26	+	-	AE48	+	-
AE5	+	+	AE27	-	-	AE49	+	-
AE6	-	-	AE28	-	+	AE50	-	+
AE7	-	-	AE29	+	-	AE51	+	-
AE8	-	-	AE30	-	-	AE52	+	-
AE9	-	-	AE31	-	-	AE53	-	-
AE10	+	+	AE32	+	-	AE54	+	+
AE11	+	+	AE33	-	-	AE55	-	-
AE12	-	-	AE34	-	+	AE56	+	-
AE13	-	-	AE35	+	+	AE57	+	+
AE14	-	-	AE36	+	+	AE58	+	-
AE15	+	-	AE37	+	+	AE59	+	-
AE16	+	+	AE38	+	+	AE60	+	+
AE17	+	+	AE39	+	-	AE61	-	-
AE18	+	-	AE40	-	-	AE62	+	-
AE19	+	+	AE41	-	+	AE63	+	+
AE20	+	+	AE42	+	-	AE64	+	+
AE21	+	+	AE43	+	+	AE65	+	-
AE22	+	-	AE44	+	-	AE66	+	-
						SB	+	+

SB: Standart bakteri.

Şekil 4.20 ve Tablo 4.29 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 26 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE4, AE5, AE10, AE11, AE15, AE16, AE17, AE18, AE19, AE20, AE21, AE22, AE26, AE29, AE32, AE35, AE36, AE37, AE38, AE39, AE42, AE43 ve AE44) ile 14 *E. faecium* (AE48, AE49, AE51, AE52, AE54, AE56, AE57, AE58, AE59, AE60, AE62, AE63, AE64, AE65) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 41 (%62.12) suşun *tetM* genine sahip olduğu belirlenirken, belirtilen suşlar dışında kalan 25 (%37.88) suşun ise *tetM* genine sahip olmadığı saptanmıştır. Aynı zamanda, 20 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE5, AE10, AE11, AE16, AE17, AE19, AE20, AE21, AE25, AE28, AE34, AE35, AE36, AE37, AE38, AE41 ve AE43) ile 7 *E. faecium* (AE47, AE50, AE54, AE57, AE60, AE63 ve AE64) olmak üzere toplam 27 (%40.9) suşun *tetL* genine sahip olduğu belirlenirken, geriye kalan 39 (%59.1) suşun *tetL* genine sahip olmadığı saptanmıştır.

Çalışma sonucunda, deniz suyundan izole edilen ve çalışma kapsamında kullanılan *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini de içeren 66 Enterokok suşundan 21

(%31.81)'inin tetrasiklin antibiyotiğine dirençten sorumlu *tetM* ve *tetL* genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 66 Enterokok izolatının tetrasiklin direncinden sorumlu olan *tetM* ve *tetL* genlerinden *tetM* genine ve *E. faecalis* suşlarının *E. faecium* suşlarına göre daha yüksek oranda sahip olduğu ve aralarında anlamlı fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.5. ENTEROKOK SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN GENOTİPİK OLARAK GENEL DEĞERLENDİRMESİ

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun, vankomisin, streptomisin, gentamisin, kanamisin, rifampisin, ampisilin, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin antibiyotiklerine direnç genleri varlığı PZR yöntemi ile incelenmiş ve 12 farklı antibiyotik direnç geninden 4-11 arasında değişen profillerde direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, bir *E. faecium* (AE62) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 2 Enterokok suşunun en az 4 antibiyotik direnç geni profiline, bir *E. faecalis* (AE21) suşunun ise en fazla 11 antibiyotik direnç geni profiline sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan 66 Enterokok suşundan 8'i 10 antibiyotik direnç genine sahipken, 11'inin 9, 17'sinin 8, 12'sinin 7, 12'sinin 6 ve 3'ünün 5 antibiyotik direnç genine sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.30)

Tablo 4.30: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerinin genotipik olarak genel değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Antibiyotik Direnç Profili											Toplam n(%)	
	Vankomisin		Streptomisin	Gentamisin	Kanamisin	Rifampisin		Ampisilin	Eritromisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin		
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>ant(6)-la</i>	<i>acc(6')-aph(2'')</i>	<i>aphA-3</i>	<i>rpoB1</i>	<i>rpoB2</i>	<i>bla(Z)</i>	<i>ermB</i>	<i>catpIP</i>	<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	
AE1	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8 (%66.66)
AE2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8 (%66.66)
AE3	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	7 (%58.33)
AE4	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7 (%58.33)
AE5	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	7 (%58.33)
AE6	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6 (%50)
AE7	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6 (%50)
AE8	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6 (%50)
AE9	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6 (%50)
AE10	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	7 (%58.33)
AE11	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8 (%66.66)
AE12	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6 (%50)
AE13	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5 (%41.66)
AE14	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6 (%50)
AE15	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	6 (%50)
AE16	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	9 (%75)
AE17	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8 (%66.66)
AE18	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	9 (%75)
AE19	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9 (%75)
AE20	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	9 (%75)
AE21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	11 (%91.6)
AE22	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	6 (%50)

vanA ve *vanB*: Vankomisin, *ant(6)-la*: Streptomisin, *acc(6')-aph(2'')*: Gentamisin, *aphA-3*: Kanamisin, *rpoB1* ve *rpoB2*: Rifampisin, *bla(Z)*: Ampisilin, *ermB*: Eritromisin, *catpIP*: Kloramfenikol, *tetM* ve *tetL*: Tetrasiklin, n: Toplam antibiyotik direnç geni sayısı, %: Yüzde.

Tablo 4.30(devam): Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerinin genotipik olarak genel değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Antibiyotik Direnç Profili												Toplam n (%)
	Vankomisin		Streptomisin	Gentamisin	Kanamisin	Rifampisin		Ampisilin	Eritromisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin		
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>ant(6)-la</i>	<i>acc(6')-aph(2'')</i>	<i>aphA-3</i>	<i>rpoB1</i>	<i>rpoB2</i>	<i>bla(Z)</i>	<i>ermB</i>	<i>catpIP</i>	<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	
AE23	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	8 (%66.66)
AE24	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	8 (%66.66)
AE25	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	9 (%75)
AE26	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7 (%58.33)
AE27	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6 (%50)
AE28	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	10 (%83.33)
AE29	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	10 (%83.33)
AE30	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6 (%50)
AE31	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	8 (%66.66)
AE32	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7 (%58.33)
AE33	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	8 (%66.66)
AE34	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8 (%66.66)
AE35	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	9 (%75)
AE36	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE37	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	9 (%75)
AE38	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE39	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	7 (%58.33)
AE40	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	5 (%41.66)
AE41	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8 (%66.66)
AE42	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7 (%58.33)
AE43	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	9 (%75)
AE44	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	6 (%50)

vanA ve *vanB*: Vankomisin, *ant(6)-la*: Streptomisin, *acc(6')-aph(2'')*: Gentamisin, *aphA-3*: Kanamisin, *rpoB1* ve *rpoB2*: Rifampisin, *bla(Z)*: Ampisilin, *ermB*: Eritromisin, *catpIP*: Kloramfenikol, *tetM* ve *tetL*:

Tetrasiklin, n: Toplam antibiyotik direnç geni sayısı, %: Yüzde.

Tablo 4.30(devam): Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerinin genotipik olarak genel değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Antibiyotik Direnç Profili											Toplam n (%)	
	Vankomisin		Streptomisin	Gentamisin	Kanamisin	Rifampisin		Ampisilin	Eritromisin	Kloramfenikol	Tetrasiklin		
	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>ant(6)-la</i>	<i>acc(6')-aph(2'')</i>	<i>aphA-3</i>	<i>rpoB1</i>	<i>rpoB2</i>	<i>bla(Z)</i>	<i>ermB</i>	<i>catpIP</i>	<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	
AE45	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	8 (%66.66)
AE46	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	7 (%58.33)
AE47	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7 (%58.33)
AE48	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8 (%66.66)
AE49	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8 (%66.66)
AE50	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	9 (%75)
AE51	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8 (%66.66)
AE52	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	8 (%66.66)
AE53	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5 (%41.66)
AE54	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE55	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7 (%58.33)
AE56	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	9 (%75)
AE57	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE58	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	9 (%75)
AE59	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	8 (%66.66)
AE60	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE61	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	7 (%58.33)
AE62	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	4 (%33.33)
AE63	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE64	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	8 (%66.66)
AE65	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	6 (%50)
AE66	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	4 (%33.33)

vanA ve *vanB*: Vankomisin, *ant(6)-la*: Streptomisin, *acc(6')-aph(2'')*: Gentamisin, *aphA-3*: Kanamisin, *rpoB1* ve *rpoB2*: Rifampisin, *bla(Z)*: Ampisilin, *ermB*: Eritromisin, *catpIP*: Kloramfenikol, *tetM* ve *tetL*: Tetrasiklin, **n**: Toplam antibiyotik direnç geni sayısı, %: Yüzde.

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarının antibiyotik direnç genlerinin bulunma sıklığı Tablo 4.31’de gösterilmiştir.

Tablo 4.31: Enterokok suşlarında antibiyotik direnç genlerinin dağılım sıklığı.

Antibiyotik Direnç profili	Gen	Bulunma Sıklığı (%)			Toplam n (%)
		<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	
Vankomisin	<i>vanA</i>	15 (%32.6)	6 (%31.57)	0 (%0)	21 (%31.81)
	<i>vanB</i>	10 (%21.73)	6 (%31.57)	0 (%0)	16 (%24.24)
Streptomisin	<i>ant(6)-la</i>	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Gentamisin	<i>acc(6')-aph(2'')</i>	46 (%100)	18 (%94.73)	0 (%0)	64 (%96.96)
Kanamisin	<i>aphA-3</i>	45 (%97.82)	17 (%89.47)	0 (%0)	62 (%93.93)
Rifampisin	<i>rpoB1</i>	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
	<i>rpoB2</i>	45 (%97.82)	19 (%100)	1 (%100)	65 (%98.48)
Ampisilin	<i>bla(Z)</i>	43 (%93.47)	17 (%89.47)	0 (%0)	60 (%90.9)
Eritromisin	<i>ermB</i>	23 (%50)	16 (%84.2)	1 (%100)	40 (%60.6)
Kloramfenikol	<i>catpIP</i>	33 (%71.73)	12 (%63.15)	0 (%0)	45 (%68.18)
Tetrasiklin	<i>tetM</i>	26 (%56.52)	14 (%21.21)	1 (%100)	41 (%62.12)
	<i>tetL</i>	20 (%43.47)	7 (%36.84)	0 (%0)	27 (%40.9)

n: Bakteri sayısı.

Tablo 4.31 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 21 (%31.81)’i *vanA* ve 16 (%24.24)’sı *vanB*, 64 (%96.96)’ü *acc(6')-aph(2'')*, 62 (%93.93)’si *aphA-3*, 66 (%100)’sı *rpoB1* ve 65 (%98.48)’i *rpoB2*, 60 (%90.9)’i *bla(Z)*, 40’ı (%60.6)’i *ermB*, 45 (%68.18)’i *catpIP*, 41 (%61.12)’i *tetM* ve 27 (%40.9)’si *tetL* genine sahiptir. *E. gallinarum* suşunun tamamının rifampisin direncini kodlayan *rpoB1* ve *rpoB2*, eritromisin direncini kodlayan *ermB* ve tetrasiklin direncini kodlayan *tetM* genine sahip olduğu belirlenirken, *E. faecalis* suşlarının tamamının gentamisin direncini kodlayan *acc(6')-aph(2'')* geni ile *rpoB1* genine sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmada incelenen Enterokok suşlarının, streptomisin direncini kodlayan *ant(6)-la* genine sahip olmadığı tespit edilmiştir.

E. faecalis ve *E. faecium* suşları arasında 13 farklı antibiyotik direnç genine ait oranlar incelendiğinde, *E. faecalis* suşunun *E. faecium* suşlarına göre daha fazla sayıda antibiyotik direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda iki suşun *vanA*, *vanB*, *acc(6')-aph(2'')*, *aphA-3*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *catpIP*, *tetM* ve *tetL* genlerine sahip olması bakımından aralarında anlamlı bir fark yokken, *ermB* geninde anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

4.5.1. Enterokok Suşlarında Virulans Faktörlerini Kodlayan Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Gösterilmesi

Bu çalışmada, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı ifade eden *ace* (320 bp) (Şekil 4.21), jelatinaz aktivitesi ifade eden *gelE* (402 bp) (Şekil 4.22), yüzey proteini varlığını ifade eden *esp* (955 bp) (Şekil 4.23), sitolizin üretimini ifade eden *cylM* (742 bp), *cylB* (843 bp), *cylA* (517 bp) (Şekil 4.24), *E. faecalis* adezyon proteini varlığını ifade eden *efaAfs* (705 bp) ve *efaAfm* (735 bp) (Şekil 4.25), seks feromonunu ifade eden *cpd* (782 bp), *ccf* (543 bp) ve *cob* (1405 bp) (Şekil 4.26), agregasyon faktörü üretimini ifade eden *agg* (1553 bp) (Şekil 4.27), jelatinaz ve serin proteazın ifadesini düzenleyen *fsr* (3268 bp) (Şekil 4.28) genlerinin varlığı PZR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

4.5.1.1. Hücre Dışı Matriks Proteinlerine Bağlanmayı İfade Eden *ace* Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı ifade eden 320 bp uzunluğundaki *ace* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.21 ve Tablo 4.32’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21: Enterokok suşlarında *ace* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.32: Enterokok suşlarında *ace* geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

Bakteri No.	<i>ace</i> geni	Bakteri No.	<i>ace</i> geni	Bakteri No.	<i>ace</i> geni
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	+	AE25	+	AE47	-
AE4	-	AE26	+	AE48	-
AE5	-	AE27	+	AE49	-
AE6	+	AE28	+	AE50	-
AE7	+	AE29	+	AE51	-
AE8	+	AE30	+	AE52	-
AE9	+	AE31	+	AE53	-
AE10	+	AE32	+	AE54	-
AE11	+	AE33	+	AE55	-
AE12	+	AE34	+	AE56	-
AE13	+	AE35	-	AE57	-
AE14	+	AE36	-	AE58	-
AE15	+	AE37	+	AE59	-
AE16	+	AE38	+	AE60	-
AE17	+	AE39	+	AE61	-
AE18	+	AE40	+	AE62	-
AE19	+	AE41	+	AE63	-
AE20	+	AE42	+	AE64	-
AE21	+	AE43	-	AE65	-
AE22	-	AE44	+	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.32 incelendiğinde, 40 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE6, AE7, AE8, AE9, AE10, AE11, AE12, AE13, AE14, AE15, AE16, AE17, AE18, AE19, AE20, AE21, AE23, AE24, AE25, AE26, AE27, AE28, AE29, AE30, AE31, AE32, AE33, AE34, AE37, AE38, AE39, AE40, AE41, AE42, AE44, AE45 ve AE46) suşun *ace* genine sahip olduğu belirlenirken, diğer 6 *E. faecalis* ile birlikte *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarının *ace* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. *E. faecalis* suşları *E. faecium* suşlarına göre daha yüksek oranda hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı ifade eden *ace* genine sahip olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).

4.5.1.2. Jelatinaz Aktivitesini Kodlayan *gelE* Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun jelatinaz enzimi üretimini ifade eden 402 bp uzunluğundaki *gelE* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.22 ve Tablo 4.33'te gösterilmiştir.



Şekil 4.22: Enterokok suşlarında *gelE* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.33: Enterokok suşlarında *gelE* geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

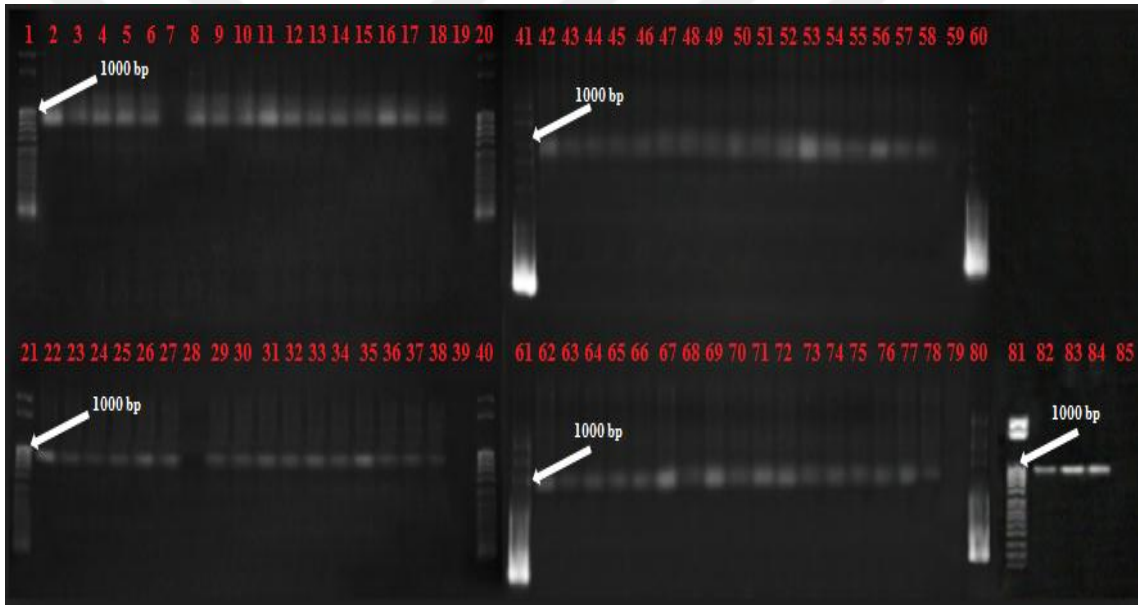
Bakteri No.	<i>gelE</i> geni	Bakteri No.	<i>gelE</i> geni	Bakteri No.	<i>gelE</i> geni
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	-	AE25	+	AE47	+
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	+	AE27	+	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	-
AE7	+	AE29	+	AE51	+
AE8	+	AE30	+	AE52	+
AE9	+	AE31	+	AE53	+
AE10	+	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	+	AE56	+
AE13	+	AE35	+	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	+
AE15	+	AE37	+	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	-	AE39	+	AE61	+
AE18	+	AE40	-	AE62	-
AE19	+	AE41	+	AE63	+
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	-	AE43	+	AE65	+
AE22	+	AE44	+	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.33 incelendiğinde, 4 *E. faecalis* (AE3, AE17, AE21 ve AE40) ile 2 *E. faecium* (AE50 ve AE62) ve bir *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 7 suş dışında kalan 59 (%89.4) suşun *gelE* genine sahip olduğu saptanmıştır. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları arasında jelatinaz enzimini kodlayan *gelE* geninin bulunma sıklığı bakımından anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

4.5.1.3. Yüzey Proteini Varlığını İfade Eden *esp* Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun yüzey proteini varlığını ifade eden 955 bp uzunluğundaki *esp* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.23 ve Tablo 4.34'te gösterilmiştir.



Şekil 4.23: Enterokok suşlarında *esp* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.34: Enterokok suşlarında *esp* geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

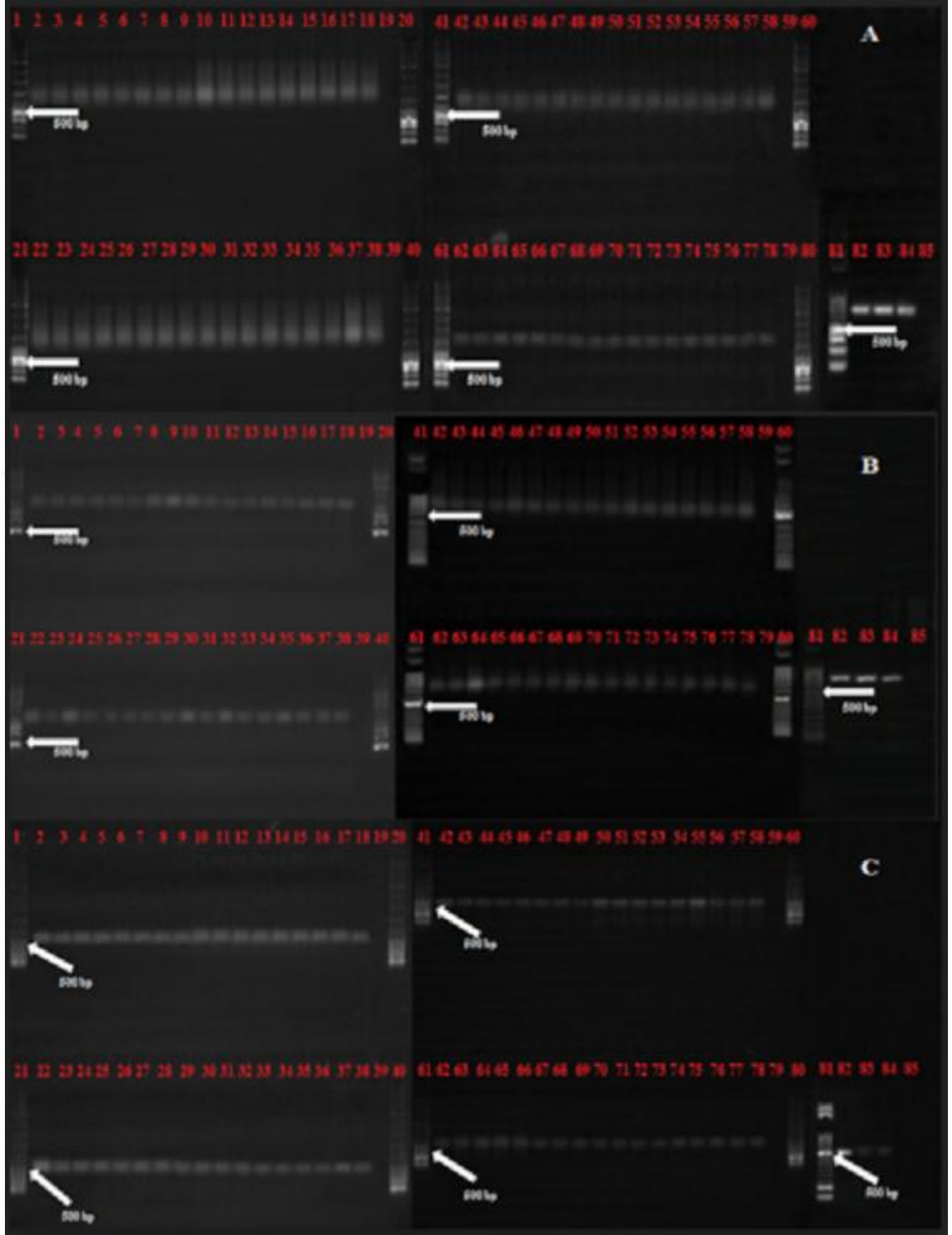
Bakteri No.	<i>esp</i> geni	Bakteri No.	<i>esp</i> geni	Bakteri No.	<i>esp</i> geni
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	+	AE25	+	AE47	+
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	-	AE27	+	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	-
AE7	+	AE29	+	AE51	+
AE8	+	AE30	+	AE52	+
AE9	+	AE31	+	AE53	+
AE10	+	AE32	+	AE54	+
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	+	AE56	+
AE13	+	AE35	+	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	+
AE15	+	AE37	+	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	+	AE39	+	AE61	+
AE18	+	AE40	+	AE62	+
AE19	+	AE41	+	AE63	+
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	+	AE65	+
AE22	-	AE44	+	AE66	+
				SB	+

SB: Standart suş.

Tablo 4.34 incelendiğinde, 2 *E. faecalis* (AE5 ve AE22) ile bir *E. faecium* (AE50) olmak üzere toplam 3 Enterokok suşunun dışında kalan 63 (%95.45) suşun ise *esp* genine sahip olduğu ve aralarında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

4.5.1.4. Sitolizin Üretimini İfade Eden *cylM*, *cylB* ve *cylA* Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun sitolizin üretimini ifade eden 742 bp uzunluğundaki *cylM*, 843 bp uzunluğundaki *cylB*, 517 bp uzunluğundaki *cylA* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.24 ve Tablo 4.35'te gösterilmiştir.



Şekil 4.24: Enterokok suşlarında *cylM*, *cylB* ve *cylA* virulans genlerine ait PZR ürünlerinin jel elektroferez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol. **A:** *cylM*; **B:** *cylB*; **C:** *cylA*.

Tablo 4.35: Enterokok suşlarında *cylM*, *cylB* ve *cylA* genlerinin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

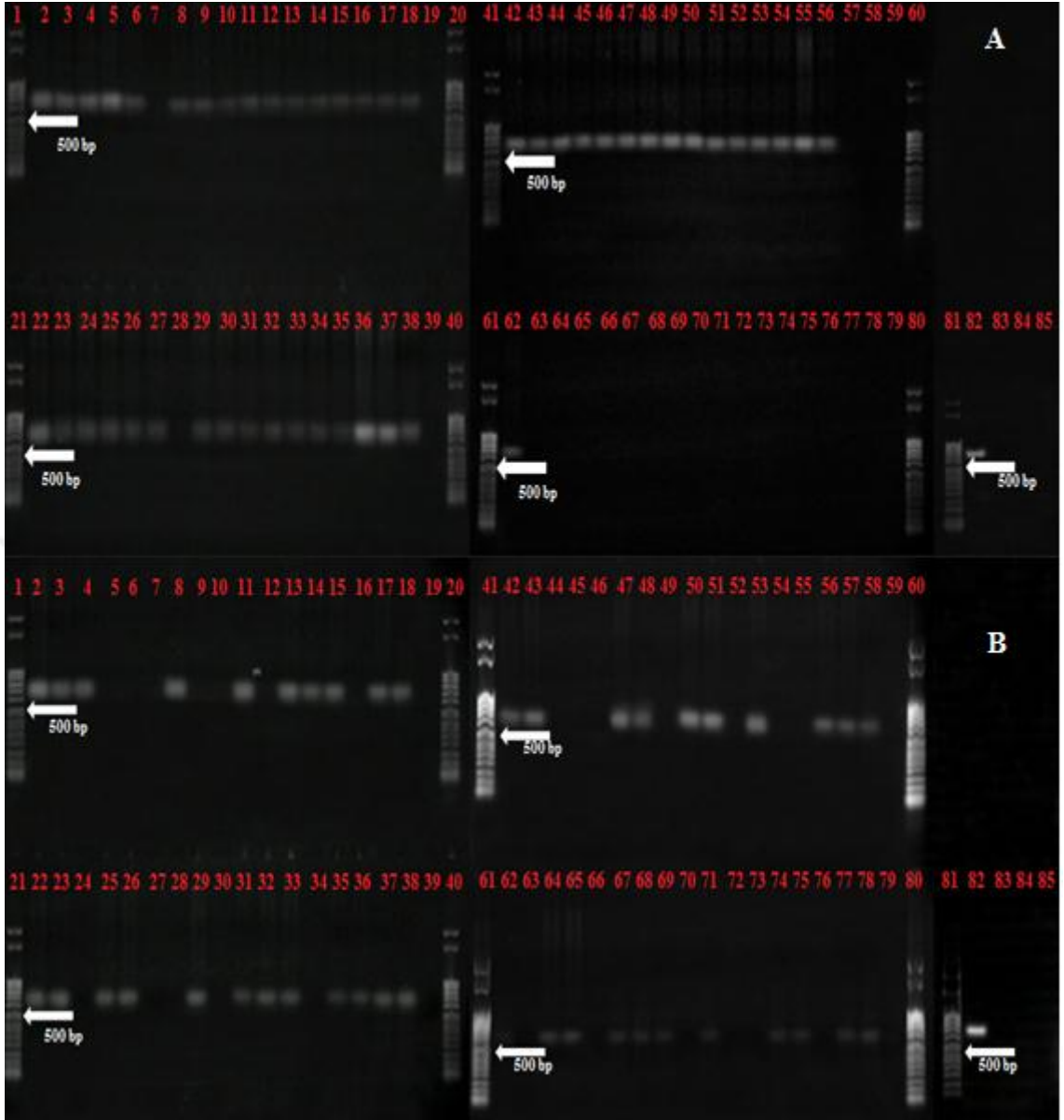
Bakteri No.	Sitolizin Üretimi			Bakteri No.	Sitolizin Üretimi			Bakteri No.	Sitolizin Üretimi		
	<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>		<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>		<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>
AE1	+	+	+	AE23	+	+	+	AE45	+	+	+
AE2	+	+	+	AE24	+	+	+	AE46	+	+	+
AE3	+	+	+	AE25	+	+	+	AE47	+	+	+
AE4	+	+	+	AE26	+	+	+	AE48	+	+	+
AE5	+	+	+	AE27	+	+	+	AE49	+	+	+
AE6	+	+	+	AE28	+	+	+	AE50	+	+	+
AE7	+	+	+	AE29	+	+	+	AE51	+	+	+
AE8	+	+	+	AE30	+	+	+	AE52	+	+	+
AE9	+	+	+	AE31	+	+	+	AE53	+	+	+
AE10	+	+	+	AE32	+	+	+	AE54	+	+	+
AE11	+	+	+	AE33	+	+	+	AE55	+	+	+
AE12	+	+	+	AE34	+	+	+	AE56	+	+	+
AE13	+	+	+	AE35	+	+	+	AE57	+	+	+
AE14	+	+	+	AE36	+	+	+	AE58	+	+	+
AE15	+	+	+	AE37	+	+	+	AE59	+	+	+
AE16	+	+	+	AE38	+	+	+	AE60	+	+	+
AE17	+	+	+	AE39	+	+	+	AE61	+	+	+
AE18	+	+	+	AE40	+	+	+	AE62	+	+	+
AE19	+	+	+	AE41	+	+	+	AE63	+	+	+
AE20	+	+	+	AE42	+	+	+	AE64	+	+	+
AE21	+	+	+	AE43	+	+	+	AE65	+	+	+
AE22	+	+	+	AE44	+	+	+	AE66	+	+	+
								SB	+	+	+

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.35 incelendiğinde, *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini de içeren 66 Enterokok suşunun tamamının (%100) sitolizin üretimini ifade eden *cylM*, *cylB* ve *cylA* genlerine sahip olduğu belirlenmiştir.

4.5.1.5. Enterokok Suşlarında Adezyon proteini Varlığını İfade Eden *efaAfs* ve *efaAfm* Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun *E. faecalis* adezyon proteini varlığını ifade eden 705 bp uzunluğundaki *efaAfs* ve 735 bp uzunluğundaki *efaAfm* genleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.25 ve Tablo 4.36'da gösterilmiştir.



Şekil 4.25: Enterokok suşlarında *efaAfs* ve *efaAfm* virulans genlerine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol. **A:** *efaAfs*; **B:** *efaAfm*.

Tablo 4.36: Enterokok suşlarında *efaAfs* ve *efaAfm* genlerinin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

Bakteri No.	Adezyon Proteini		Bakteri No.	Adezyon Proteini		Bakteri No.	Adezyon Proteini	
	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>		<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>		<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>
AE1	+	+	AE23	+	+	AE45	+	-
AE2	+	+	AE24	+	-	AE46	+	+
AE3	+	-	AE25	+	+	AE47	-	+
AE4	+	-	AE26	+	+	AE48	-	+
AE5	-	-	AE27	+	+	AE49	-	-
AE6	+	+	AE28	+	-	AE50	-	+
AE7	+	-	AE29	+	+	AE51	-	+
AE8	+	-	AE30	+	+	AE52	-	-
AE9	+	+	AE31	+	+	AE53	-	+
AE10	+	-	AE32	+	+	AE54	-	+
AE11	+	+	AE33	+	+	AE55	-	+
AE12	+	+	AE34	+	-	AE56	-	-
AE13	+	+	AE35	+	-	AE57	-	+
AE14	+	-	AE36	+	-	AE58	-	-
AE15	+	+	AE37	+	+	AE59	-	-
AE16	+	+	AE38	+	+	AE60	-	+
AE17	+	+	AE39	+	-	AE61	-	+
AE18	+	-	AE40	+	+	AE62	-	-
AE19	+	+	AE41	+	+	AE63	-	+
AE20	+	+	AE42	+	-	AE64	-	+
AE21	+	-	AE43	+	+	AE65	-	-
AE22	-	-	AE44	+	-	AE66	-	-
						SB	+	+

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.36 incelendiğinde, 46 *E. faecalis* suşundan 44'ünün (%66.66) (AE1, AE2, AE3, AE4, AE6-AE20, AE22-AE46) suşun *efaAfs* genine sahip olduğu, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarının ise *efaAfs* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. Diğer yandan, 66 Enterokok suşundan 27 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE6, AE9, AE11, AE12, AE13, AE15, AE16, AE17, AE19, AE20, AE23, AE25, AE26, AE27, AE29-AE33, AE37, AE38, AE40, AE41, AE43 ve AE46) ile 12 *E. faecium* (AE47, AE48, AE50, AE51, AE53, AE54, AE55, AE57, AE60, AE61, AE63 ve AE64) olmak üzere toplam 39 (%59.09) suşun *efaAfm* genine sahip olduğu, kalan 27 (%40.91) suşun ise *efaAfm* genine sahip olmadığı saptanmıştır. Çalışma sonucunda beklenen şekilde sadece *E. faecalis* izolatlarının, *E. faecalis*'e özgü adezyon proteinin kodlanmasından sorumlu gen olan *efaAfs* genine sahip olduğu ve iki tür arasında anlamlı bir farkın olduğu ($p < 0.05$), *efaAfm* geni için ise anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$).

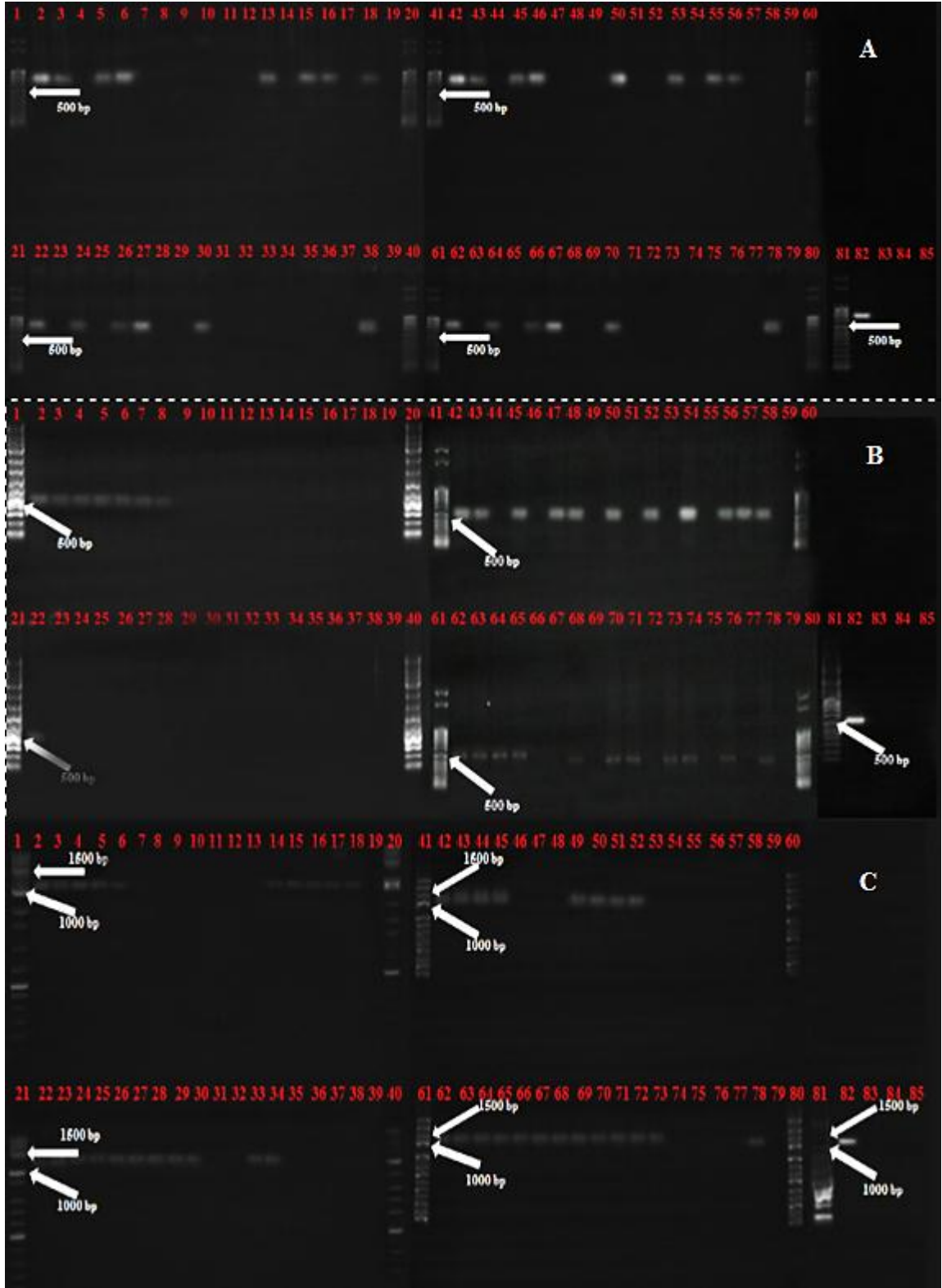
4.5.1.6. Seks Feromonunu İfade Eden *cpd*, *ccf* ve *cob* Genlerinin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun seks feromonunu ifade eden 782 bp uzunluğundaki *cpd*, 543 bp uzunluğundaki *ccf* ve 1405 bp uzunluğundaki *cob* genleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.26 ve Tablo 4.37’de gösterilmiştir.

Şekil 4.26 ve Tablo 4.37 incelendiğinde, 19 *E. faecalis* (AE1, AE3, AE4, AE11, AE13, AE14, AE16, AE18, AE20, AE21, AE24, AE32, AE33, AE35, AE36, AE40, AE43, AE45 ve AE46) ile 5 *E. faecium* (AE50, AE52, AE53, AE56 ve AE64) olmak üzere toplam 24 (%36.36) suşun *cpd* genine sahip olduğu, kalan 28 (%63.63) suşun ise *cpd* genine sahip olmadığı saptanmıştır. 14 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE4, AE5, AE6, AE33, AE35, AE37, AE38, AE40, AE42, AE44 ve AE46) ile 12 *E. faecium* (AE47, AE48, AE49, AE50, AE51, AE54, AE56, AE57, AE59, AE60, AE62 ve AE64) olmak üzere toplam 26 (%39.4) suşun *ccf* genine sahip olduğu, kalan 40 (%60.6) suşun ise *ccf* genine sahip olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda, 26 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE3, AE4, AE12-AE24, AE27, AE28, AE33, AE34, AE35, AE39, AE40, AE41 ve AE42) ve 12 *E. faecium* (AE49-AE59 ve AE64) olmak üzere toplam 38 (%57.57) suşun *cob* genine sahip olduğu saptanmıştır.

Çalışma sonucunda 6 *E. faecalis* (AE1, AE3, AE4, AE33, AE35, AE40) ve 3 *E. faecium* (AE50, AE56, AE64) olmak üzere toplam 9 (%13.63) Enterokok suşunun seks feromonlarını kodlayan *cpd*, *ccf* ve *cob* genlerinden her üçüne de sahip olduğu saptanmıştır.

E. faecalis suşlarının *E. faecium* suşlarına oranla seks feromonları olan *cpd*, *ccf* ve *cob* genlerine daha yüksek oranda sahip olduğu, iki tür arasında *cpd* ve *cob* geni bakımından anlamlı bir fark olmadığı ($p>0.05$), *ccf* geninde ise anlamlı bir farkın olduğu ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.26: Enterokok suşlarında *cpd*, *ccf* ve *cob* virulans genlerine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 50 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol. **A:** *cpd*; **B:** *ccf*; **C:** *cob*.

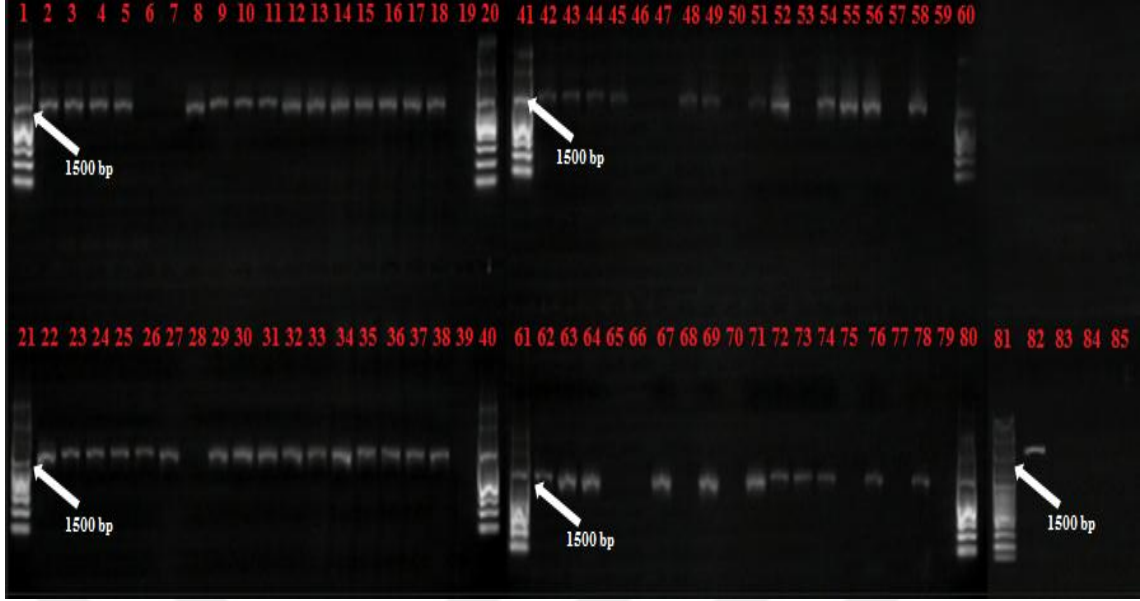
Tablo 4.37: Enterokok suşlarında *cpd*, *ccf* ve *cob* genlerinin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

Bakteri No.	Seks Feromonu			Bakteri No.	Seks Feromonu			Bakteri No.	Seks Feromonu		
	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>cob</i>		<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>cob</i>		<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>cob</i>
AE1	+	+	+	AE23	-	-	+	AE45	+	-	-
AE2	-	+	+	AE24	+	-	+	AE46	+	+	-
AE3	+	+	+	AE25	-	-	-	AE47	-	+	-
AE4	+	+	+	AE26	-	-	-	AE48	-	+	-
AE5	-	+	-	AE27	-	-	+	AE49	-	+	+
AE6	-	+	-	AE28	-	-	+	AE50	+	+	+
AE7	-	-	-	AE29	-	-	-	AE51	-	+	+
AE8	-	-	-	AE30	-	-	-	AE52	+	-	+
AE9	-	-	-	AE31	-	-	-	AE53	+	-	+
AE10	-	-	-	AE32	+	-	-	AE54	-	+	+
AE11	+	-	-	AE33	+	+	+	AE55	-	-	+
AE12	-	-	+	AE34	-	-	+	AE56	+	+	+
AE13	+	-	+	AE35	+	+	+	AE57	-	+	+
AE14	+	-	+	AE36	+	-	-	AE58	-	-	+
AE15	-	-	+	AE37	-	+	-	AE59	-	+	+
AE16	+	-	+	AE38	-	+	-	AE60	-	+	-
AE17	-	-	+	AE39	-	-	+	AE61	-	-	-
AE18	+	-	+	AE40	+	+	+	AE62	-	+	-
AE19	-	-	+	AE41	-	-	+	AE63	-	-	-
AE20	+	-	+	AE42	-	+	+	AE64	+	+	+
AE21	+	-	+	AE43	+	-	-	AE65	-	-	-
AE22	-	-	+	AE44	-	+	-	AE66	-	-	-
								SB	+	+	+

SB: Standart bakteri.

4.5.1.7. Agregasyon Faktörünü İfade Eden *agg* Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun agregasyon faktörü varlığını ifade eden 1553 bp uzunluğundaki *agg* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.27 ve Tablo 4.38’de gösterilmiştir.



Şekil 4.27: Enterokok suşlarında *agg* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 100 bp DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.38: Enterokok suşlarında *agg* geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

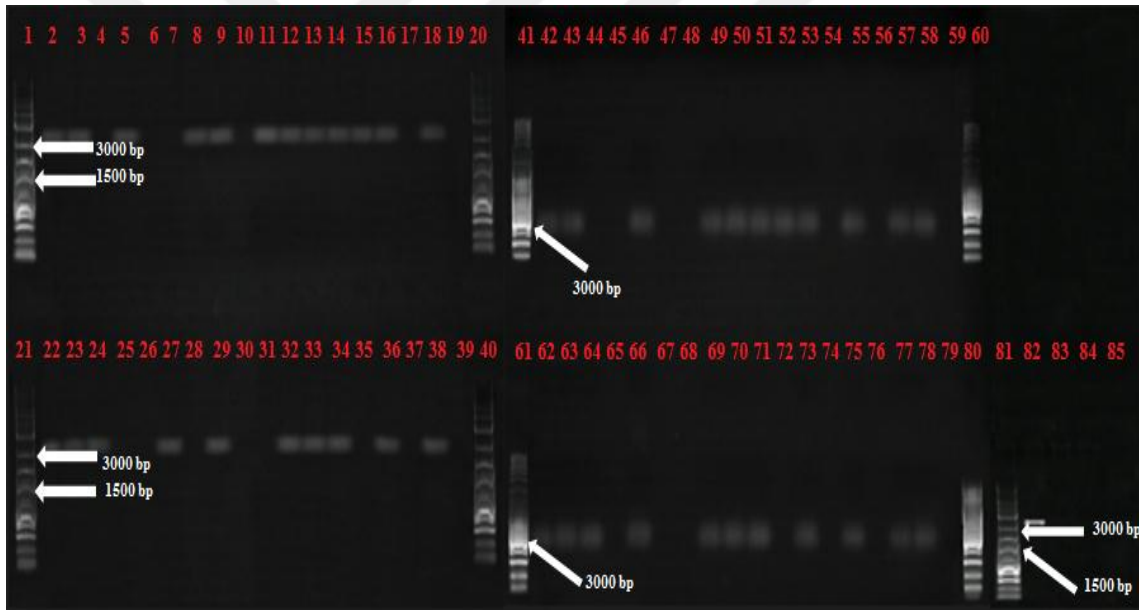
Bakteri No.	<i>agg</i> geni	Bakteri No.	<i>agg</i> geni	Bakteri No.	<i>agg</i> geni
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	+	AE46	+
AE3	+	AE25	+	AE47	-
AE4	-	AE26	+	AE48	+
AE5	-	AE27	+	AE49	+
AE6	+	AE28	+	AE50	+
AE7	+	AE29	+	AE51	-
AE8	+	AE30	+	AE52	-
AE9	+	AE31	+	AE53	+
AE10	+	AE32	+	AE54	-
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	+	AE56	-
AE13	+	AE35	+	AE57	+
AE14	+	AE36	-	AE58	+
AE15	+	AE37	-	AE59	+
AE16	+	AE38	+	AE60	+
AE17	+	AE39	+	AE61	-
AE18	+	AE40	-	AE62	+
AE19	+	AE41	+	AE63	-
AE20	+	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	-	AE65	-
AE22	-	AE44	+	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.38 incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 50 (%75.76)'sinin *agg* genine sahip olduğu, kalan 7 *E. faecalis* (AE4, AE5, AE22, AE36, AE37, AE40 ve AE43) ile 8 *E. faecium* (AE47, AE51, AE52, AE54, AE56, AE61, AE63 ve AE65) ve 1 *E. gallinarum* (AE66) olmak üzere toplam 16 (%24.24) suşun *agg* genine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan 66 Enterokok suşundan *E. faecalis*'in *E. faecium*'a göre daha yüksek oranda *agg* genine sahip olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

4.5.1.8. Jelatinaz ve Serin Proteazın İfadesini Düzenleyen *fsr* Geninin PZR Yöntemi ile Gösterilmesi

E. faecalis, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerini içeren 66 Enterokok suşunun jelatinaz ve serin proteazın ifadesini düzenleyen 3268 bp uzunluğundaki *fsr* geni incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.28 ve Tablo 4.39'da gösterilmiştir.



Şekil 4.28: Enterokok suşlarında *fsr* virulans genine ait PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri. **1, 20, 21, 40, 41, 60, 61, 80, 81:** 1 kb plus DNA Marker; **2, 22, 42, 62, 82:** Pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212); **3-18, 23-38, 43-56:** AE1-AE46 (*E. faecalis*); **57, 58, 63-78, 83:** AE47-AE65 (*E. faecium*); **84:** AE66 (*E. gallinarum*); **19, 39, 59, 79, 85:** Negatif kontrol.

Tablo 4.39: Enterokok suşlarında *fsr* geninin PZR yöntemi ile gösterilmesi.

Bakteri No.	<i>fsr</i> geni	Bakteri No.	<i>fsr</i> geni	Bakteri No.	<i>fsr</i> geni
AE1	+	AE23	+	AE45	+
AE2	+	AE24	-	AE46	-
AE3	-	AE25	-	AE47	+
AE4	+	AE26	+	AE48	+
AE5	-	AE27	+	AE49	+
AE6	-	AE28	+	AE50	+
AE7	+	AE29	-	AE51	-
AE8	+	AE30	+	AE52	+
AE9	-	AE31	-	AE53	-
AE10	+	AE32	+	AE54	-
AE11	+	AE33	+	AE55	+
AE12	+	AE34	-	AE56	+
AE13	+	AE35	-	AE57	+
AE14	+	AE36	+	AE58	-
AE15	-	AE37	-	AE59	+
AE16	+	AE38	-	AE60	-
AE17	+	AE39	+	AE61	+
AE18	+	AE40	+	AE62	-
AE19	-	AE41	+	AE63	+
AE20	-	AE42	+	AE64	+
AE21	+	AE43	+	AE65	-
AE22	-	AE44	-	AE66	-
				SB	+

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.39 incelendiğinde, 28 *E. faecalis* (AE1, AE2, AE4, AE7, AE8, AE10-AE14, AE16-AE18, AE21, AE23, AE26-AE28, AE30, AE32, AE33, AE36, AE39-AE43 ve AE45) ile 12 *E. faecium* (AE47-AE50, AE52, AE55-AE57, AE59, AE61, AE63 ve AE64) olmak üzere toplam 40 (%60.6) suşun *fsr* genine sahip olduğu, kalan 26 (%40.4) suşun ise *fsr* genine sahip olmadığı saptanmıştır. Çalışma sonucunda *fsr* geninin *E. faecalis* suşlarında *E. faecium* suşlarına göre daha fazla suşta bulunmasına rağmen aralarında anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

4.6. ENTEROKOK SUŞLARINDA VİRULANS GENLERİNİN GENOTİPİK OLARAK GENEL DEĞERLENDİRMESİ

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşuna ait virulans genlerinin (*ace*, *gelE*, *esp*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *ccf*, *cob*, *agg* ve *fsr*) genotipik olarak genel değerlendirme sonuçları Tablo 4.40 ve Tablo 4.41’de gösterilmiştir.

Virulans faktörleri genotipik olarak incelendiğinde, *E. gallinarum* (AE66) suşunun en az 3 virulans genine (*cylM*, *cylB*, *cylA*), 2 *E. faecalis* (AE1 ve AE33) suşunun ise en fazla 12 virulans genine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.40).



Tablo 4.40: Enterokok suşlarında virulans genlerinin genotipik olarak genel değerlendirmesi.

Bakteri No.	Virulans Genleri												Toplam n ₁ (%)
	Hücre Dışı Matriks Proteinlerine Bağlanma	Jelatinaz	Sitolizin			Adezyon		Seks Feromonları			Agregasyon Faktörü	Jelatinaz ve Serin Proteaz ifadesini Düzenleme	
	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>cob</i>	<i>agg</i>	<i>fsr</i>	
AE1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12 (%100)
AE2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	11 (%91.66)
AE3	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	9 (%75)
AE4	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	9 (%75)
AE5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	5 (%41.66)
AE6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	9 (%75)
AE7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	8 (%66.66)
AE8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	8 (%66.66)
AE9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	8 (%66.66)
AE10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	8 (%66.66)
AE11	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	10 (%83.33)
AE12	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (%83.33)
AE13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	11 (%91.66)
AE14	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	10 (%83.33)
AE15	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	9 (%75)
AE16	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	11 (%91.66)
AE17	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	9 (%75)
AE18	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	10 (%83.33)
AE19	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	9 (%75)
AE20	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	10 (%83.33)
AE21	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	9 (%75)
AE22	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	5 (%41.66)

n₁: Toplam virulans faktörü sayısı.

Tablo 4.40(devam): Enterokok suşlarında virulans genlerinin genotipik olarak değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Virulans Genleri												Toplam n ₁ (%)
	Hücre Dışı Matriks Proteinlerine Bağlanma	Jelatinaz	Sitolizin			Adezyon		Seks Feromonları			Agregasyon Faktörü	Jelatinaz ve Serin Proteaz ifadesini Düzenleme	
	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>cob</i>	<i>agg</i>	<i>fsr</i>	
AE23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (%83.33)
AE24	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	9 (%75)
AE25	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	8 (%66.66)
AE26	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	9 (%75)
AE27	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (%83.33)
AE28	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	9 (%75)
AE29	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	8 (%66.66)
AE30	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	9 (%75)
AE31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	8 (%66.66)
AE32	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	10 (%83.33)
AE33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12 (%100)
AE34	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	8 (%66.66)
AE35	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	9 (%75)
AE36	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	7 (%58.33)
AE37	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	8 (%66.66)
AE38	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	9 (%75)
AE39	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	9 (%75)
AE40	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	10 (%83.33)
AE41	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	10 (%83.33)
AE42	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE43	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	8 (%66.66)
AE44	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	8 (%66.66)

n₁, Toplam virulans faktörü sayısı.

Tablo 4.40(devam): Enterokok suşlarında virulans genlerinin genotipik olarak değerlendirilmesi.

Bakteri No.	Virulans Genleri												Toplam n ₁ (%)
	Hücre Dışı Matriks Proteinlerine Bağlanma	Jelatinaz	Sitolizin			Adezyon		Seks Feromonları			Agregasyon Faktörü	Jelatinaz ve Serin Proteaz ifadesini Düzenleme	
	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>cob</i>	<i>agg</i>	<i>fsr</i>	
AE45	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	9 (%75)
AE46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	10 (%83.33)
AE47	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	7 (%58.33)
AE48	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	8 (%66.66)
AE49	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	8 (%66.66)
AE50	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	9 (%75)
AE51	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	7 (%58.33)
AE52	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	7 (%58.33)
AE53	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	8 (%66.66)
AE54	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	7 (%58.33)
AE55	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	8 (%66.66)
AE56	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	8 (%66.66)
AE57	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	9 (%75)
AE58	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	6 (%50)
AE59	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	8 (%66.66)
AE60	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	7 (%58.33)
AE61	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	6 (%50)
AE62	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	5 (%41.66)
AE63	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	6 (%50)
AE64	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	10 (%83.33)
AE65	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	4 (%33.33)
AE66	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3 (%25)
Toplam n (%)	40 (%60.6)	59 (%89.4)	66 (%100)	66 (%100)	66 (%100)	44 (%66.66)	39 (%59.09)	24 (%36.36)	26 (%39.4)	38 (%57.57)	50 (%75.75)	40 (%60.6)	

n: Toplam bakteri sayısı, n₁: Toplam virulans faktörü sayısı.

66 Enterokok suşunda 12 (*ace*, *gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *ccf*, *cob*, *agg* ve *fsr*) virulans faktörü PZR yöntemi ile incelenmiş ve çalışma sonucunda suşların 40 (%60.6)'ının hücre dışı matris proteinlerine bağlanmadan sorumlu *ace*, 59 (%89.4)'unun jelatinaz enzimini kodlayan *gelE*, 66 suşun tamamının (%100) sitolizin üretiminden sorumlu *cylM*, *cylB* ve *cylA*, sırasıyla 44 (%66.66) ve 39 (%59.09)'unun Enterokok yüzey proteini olan *efaAfs* ve *efaAfm*, sırasıyla 24 (%36.36), 26 (%39.4) ve 38 (%57.57)'inin seks feromonlarını kodlayan *cpd*, *ccf* ve *cob* genlerine, 50 (%75.75)'sinin agregasyon faktörünü kodlayan *agg* ve 40 (%60.6)'ının jelatinaz ve serin proteaz ifadesini düzenleyen *fsr* genine sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.40).

Çalışmada, 66 Enterokok suşunda virulans genlerinin *E.faecalis*, *E.faecium* ve *E.gallinarum* türlerindeki bulunma sıklığı Tablo 4.41'de gösterilmiştir.

Tablo 4.41: Enterokok suşlarında virulans genlerinin bulunma sıklığı.

Virulans Gen Profili	Gen	Bulunma Sıklığı (%)			Toplam n (%)
		<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	
Hücre dışı matris proteinlerine bağlanma	<i>ace</i>	40 (%86.9)	0 (%0)	0 (%0)	40 (%60.6)
Jelatinaz	<i>gelE</i>	42 (%91.3)	17 (%89.4)	0 (%0)	59 (%89.4)
	<i>cylM</i>	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
Sitolizin	<i>cylB</i>	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
	<i>cylA</i>	46 (%100)	19 (%100)	1 (%100)	66 (%100)
Adezyon	<i>efaAfs</i>	44 (%95.6)	0 (%0)	0 (%0)	44 (%66.66)
	<i>efaAfm</i>	27 (%58.7)	12 (%63.1)	0 (%0)	39 (%59.09)
	<i>cpd</i>	19 (%41.3)	5 (%26.3)	0 (%0)	24 (%36.36)
Seks feromonları	<i>ccf</i>	14 (%30.4)	12 (%63.1)	0 (%0)	26 (%39.4)
	<i>cob</i>	26 (%56.5)	12 (%63.1)	0 (%0)	38 (%57.57)
Agregasyon faktörü	<i>agg</i>	39 (%84.7)	11 (%57.9)	0 (%0)	50 (%75.75)
Jelatinaz ve serin proteaz ifadesini düzenleme	<i>fsr</i>	28 (%60.8)	12 (%63.1)	0 (%0)	40 (%60.6)

n: Bakteri sayısı.

Tablo 4.41 incelendiğinde, incelenen 66 Enterokok suşunun tamamının sitolizin üretiminden sorumlu *cylM*, *cylB* ve *cylA* genlerine sahip olduğu belirlenmiştir. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının virulans genlerine sahip olma oranı, *ace* için %86.9 ve %0, *gelE* için %91.3 ve %89.4, *efaAfs* için %95.6 ve %0, *efaAfm* için %58.7 ve %63.1, *cpd* için %41.3 ve %26.3, *ccf* için %30.4 ve %63.1, *cob* için %56.5 ve %63.1, *agg* için %84.7 ve %57.9 ve *fsr* için %60.8 ve %63.1 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan *E. gallinarum* suşunun ise 12 virulans

faktöründen sadece sitolizin üretiminden sorumlu *cylM*, *cylB* ve *cylA* genlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada, 66 Enterokok suşunda 12 farklı virulans faktörü araştırılmış ve genel olarak *E. faecalis* suşlarının *E. faecium*'a göre daha virulan olduğu belirlenmiştir. Virulans genlerine sahip olan suşların oranları iki tür arasında kıyaslandığında, *ace*, *efaAfs*, *ccf* ve *agg* genleri için anlamlı bir farkın olduğu ($p < 0.05$) belirlenirken, *gelE*, *efaAfm*, *cpd*, *cob* ve *fsr* genleri için ise anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0.05$) saptanmıştır.

Enterokok suşlarının taşıdıkları çoklu virulans gen profilleri Tablo 4.42'de gösterilmiştir.



Tablo 4.42: Enterokok suşlarının taşıdıkları çoklu virulans gen profilleri.

Virulans Profili No.	Çoklu Virulans Profili	Virulans Gen Sayısı	Tür Adı			Toplam n (%)
			<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	
1	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf, cob, agg, fsr</i>	12	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
2	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, ccf, cob, agg, fsr</i>	11	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
3	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, cob, agg, fsr</i>	11	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
4	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cob, agg, fsr</i>	10	4 (%8.7)	0 (%0)	0 (%0)	4 (%6.06)
5	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, agg, fsr</i>	10	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
6	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, cob, agg, fsr</i>	10	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
7	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, cpd, cob, agg, fsr</i>	10	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
8	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, cob, agg</i>	10	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
9	<i>ace, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf, cob, fsr</i>	10	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
10	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, ccf, cob, agg, fsr</i>	10	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
11	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, ccf, agg</i>	10	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
12	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, cpd, ccf, cob, agg, fsr</i>	10	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
13	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, ccf, agg</i>	9	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
14	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cob, agg</i>	9	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
15	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, agg, fsr</i>	9	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
16	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cob, agg, fsr</i>	9	2 (%4.34)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%3.03)
17	<i>ace, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, ccf, cob, agg</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
18	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, ccf, cob, fsr</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
19	<i>ace, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cob, agg, fsr</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
20	<i>ace, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, cob, agg, fsr</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
21	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, cob, agg</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
22	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, ccf, cob, agg</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
23	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, agg, fsr</i>	9	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
24	<i>cylM, cylB, cylA, efaAfm, cpd, ccf, cob, agg, fsr</i>	9	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
25	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, ccf, cob, agg, fsr</i>	9	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
26	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, agg</i>	8	4 (%8.7)	0 (%0)	0 (%0)	4 (%6.06)
27	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, agg, fsr</i>	8	3 (%6.52)	0 (%0)	0 (%0)	3 (%4.54)
28	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, ccf, cob, agg, fsr</i>	8	0 (%0)	2 (%10.52)	0 (%0)	2 (%3.03)
29	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cob, agg</i>	8	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
30	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, ccf</i>	8	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
31	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, efaAfm, cpd, fsr</i>	8	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
32	<i>ace, gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, ccf, agg</i>	8	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
33	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, ccf, agg, fsr</i>	8	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
34	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, cpd, cob, agg</i>	8	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
35	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, cob, agg, fsr</i>	8	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
36	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, cpd, ccf, cob, fsr</i>	8	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
37	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, ccf, cob</i>	7	0 (%0)	2 (%10.52)	0 (%0)	2 (%3.03)

n: Çoklu virulans profiline sahip bakteri sayısı.

Tablo 4.42(devam): Enterokok suşlarının taşıdıkları çoklu virulans gen profilleri.

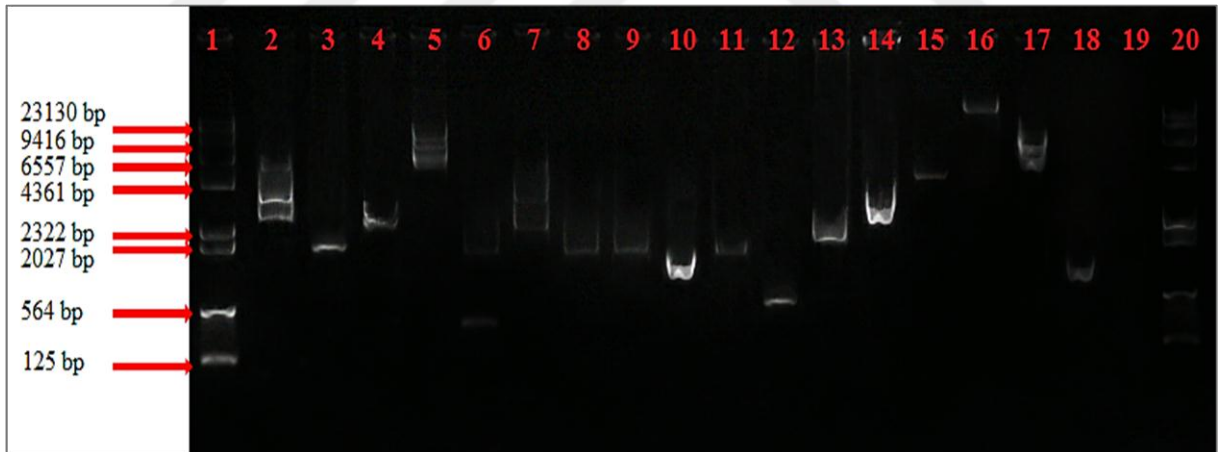
Virulans Profili No.	Çoklu Virulans Profili	Virulans Gen Sayısı	Tür Adı			Toplam n (%)
			<i>E. faecalis</i> n (%)	<i>E. faecium</i> n (%)	<i>E. gallinarum</i> n (%)	
38	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfs, cpd, fsr</i>	7	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
39	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, ccf, fsr</i>	7	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
40	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, cpd, cob, fsr</i>	7	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
41	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, ccf, agg</i>	7	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
42	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, efaAfm, fsr</i>	6	0 (%0)	2 (%10.52)	0 (%0)	2 (%3.03)
43	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, cob, agg</i>	6	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
44	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, cpd</i>	5	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
45	<i>gelE, cylM, cylB, cylA, cob</i>	5	1 (%2.17)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%1.51)
46	<i>cylM, cylB, cylA, ccf, agg</i>	5	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
47	<i>gelE, cylM, cylB, cylA</i>	4	0 (%0)	1 (%5.26)	0 (%0)	1 (%1.51)
48	<i>cylM, cylB, cylA</i>	3	0 (%0)	0 (%0)	1 (%100)	1 (%1.51)

n: Çoklu virulans profiline sahip bakteri sayısı.

Tablo 4.42 incelendiğinde, 66 Enterokok suşunun çoklu virulans gen profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 12 virulans gen bölgesi (*ace*, *gelE*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cpd*, *ccf*, *cob*, *agg* ve *fsr*) PZR yöntemi ile incelenmiş ve 66 suştan 2 (%3.03) *E. faecalis*'in (AE1 ve AE33) 12 gen bölgesi ile en fazla, bir (%1.51) *E. gallinarum*'un (AE66) 3 gen bölgesi (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) ile en az virulans profili gösterdiği saptanmıştır. Diğer yandan 66 Enterokok suşundan 3'ünün 11 virulans gen profiline sahipken, 13'ünün 10, 17'sinin 9, 17'sinin 8, 6'sının 7, 3'ünün 6, 3'ünün 5 ve birinin 4 virulans gen profiline sahip olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda çalışma sonucunda *E. faecalis* suşlarının *E. faecium*'a göre daha fazla sayıda virulans profiline sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.7. ENTEROKOK SUŞLARINDA PLAZMİT PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunda, SpinKlean Plasmid DNA Miniprep Kit (Biomatik, Canada) kullanılarak plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve plazmit DNA bantlarına ait görüntüler Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



Şekil 4.29: Enterokok suşlarında plazmit DNA bantlarının agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi. **1, 20:** λ DNA Marker, **2:** Standart suş (*E. faecalis* ATCC 29212), **3:** AE5, **4:** AE16, **5:** AE18, **6:** AE20, **7:** AE21, **8:** AE23, **9:** AE24, **10:** AE25, **11:** AE28; **12:** AE31; **13:** AE36; **14:** AE38; **15:** AE43; **16:** AE50, **17:** AE54; **18:** AE63; **19:** Negatif kontrol.

Çalışmada, DNA büyüklükleri bilinen λ DNA Marker (ThermoScientific™) kullanılarak, markerın agaroz jel elektroforezindeki göçü hesaplanmış ve standart eğri çıkartılmıştır. Korelasyon katsayısı ve eğrinin eğiminden faydalanılarak plazmit DNA'ların büyüklükleri tespit edilmiştir. Enterokok suşlarında plazmit DNA sonuçları Tablo 4.43'te belirtilmiştir.

Tablo 4.43: Enterokok suşlarında plazmit DNA sonuçları.

Bakteri No.	Plazmit Profili		Bakteri No.	Plazmit Profili		Bakteri No.	Plazmit Profili	
	Plazmit içeriği	Plazmit sayısı		Plazmit içeriği	Plazmit sayısı		Plazmit içeriği	Plazmit sayısı
AE1	-	-	AE23	+	1	AE45	-	-
AE2	-	-	AE24	+	1	AE46	-	-
AE3	-	-	AE25	+	2	AE47	-	-
AE4	-	-	AE26	-	-	AE48	-	-
AE5	+	1	AE27	-	-	AE49	-	-
AE6	-	-	AE28	+	1	AE50	+	1
AE7	-	-	AE29	-	-	AE51	-	-
AE8	-	-	AE30	-	-	AE52	-	-
AE9	-	-	AE31	+	1	AE53	-	-
AE10	-	-	AE32	-	-	AE54	+	3
AE11	-	-	AE33	-	-	AE55	-	-
AE12	-	-	AE34	-	-	AE56	-	-
AE13	-	-	AE35	-	-	AE57	-	-
AE14	-	-	AE36	+	1	AE58	-	-
AE15	-	-	AE37	-	-	AE59	-	-
AE16	+	2	AE38	+	2	AE60	-	-
AE17	-	-	AE39	-	-	AE61	-	-
AE18	+	3	AE40	-	-	AE62	-	-
AE19	-	-	AE41	-	-	AE63	+	1
AE20	+	3	AE42	-	-	AE64	-	-
AE21	+	3	AE43	+	1	AE65	-	-
AE22	-	-	AE44	-	-	AE66	-	-
						SB	+	3

SB: Standart bakteri.

Tablo 4.43 incelendiğinde, 13 *E.faecalis* (AE5, AE16, AE18, AE20, AE21, AE23, AE24, AE25, AE28, AE31, AE36, AE38 ve AE43) ile 3 *E.faecium* (AE50, AE54 ve AE63) olmak üzere toplam 16 (%24.24) suşun plazmit içerdiği saptanmıştır. Plazmit içerdiği belirlenen 16 Enterokok suşu ve standart suş olarak kullanılan *E. faecalis* ATCC 29212 suşuna ait plazmit profil büyüklükleri Tablo 4.44'te belirtilmiştir.

Tablo 4.44: Enterokok suşlarında plazmit profil büyüklükleri.

Örnek	Moleküler Büyüklüğü (bp)
λ DNA Marker	23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125
Bakteri No.	Plazmit Profil Büyüklüğü (bp)
AE5	2160
AE16	3210 3180
AE18	9560 8570 7240
AE20	2140 2020 340
AE21	6460 4080 3260
AE23	2120
AE24	2120
AE25	1580 1560
AE28	1920
AE31	752
AE36	2360
AE38	3960 3920
AE43	6400
AE50	32600
AE54	9320 7560 4020
AE63	1640
SB	6520 4280 4090

SB: Standart bakteri.

66 Enterokok suşunun sahip olduğu plazmit profilleri moleküler büyüklükleri bilinen marker ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. 13 (%28.2) *E. faecalis* (AE5, AE16, AE18, AE20, AE21, AE23, AE24, AE25, AE28, AE31, AE36, AE38, AE43) ve 3 (%15.78) *E. faecium* (AE50, AE54, AE63) suşlarının farklı moleküler büyüklükte plazmit profillerine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, bir suşun en fazla 3 plazmit içerdiği ve toplamda 26 farklı moleküler büyüklükte plazmite sahip olduğu ve plazmit büyüklüklerinin 340 ile 32600 bp arasında değiştiği tespit edilmiştir. AE23 ve AE24 kodlu 2 *E. faecalis* suşunun 2120 bp moleküler büyüklük ile aynı plazmit profiline sahip olabileceği belirlenmiştir (Tablo 4.44).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan bağırsak sisteminin normal florası olan Enterokoklar, sıcakkanlı hayvanların dışkılarından, et ve et ürünleri, balık, süt ve süt ürünleri gibi gıda örnekleri ve klinik örneklerden sıklıkla izole edilmesinin yanısıra toprak ve bitki örnekleri ile denizler, nehirler, tatlı sular, plajlar ve çöp suları gibi çevresel örneklerden de yaygın olarak izole edilebilmektedir. Fekal kirlilik indikatörü olarak bilinen ve Laktik Asit Bakterileri grubuna dahil olan patojen Enterokoklar, sahip oldukları intrinsik ve ekstrinsik antibiyotik direnç mekanizmaları ve virulans faktörleri ile enfeksiyon tedavisinde sorunlara neden olmaktadır. Enterokoklar, konak doku hücrelerine tutunmada rol oynayan reseptörlere sahip olması, adezyon proteinleri, antijenik yapıları, salgıladıkları toksinler, sahip olduğu enzimler ve biyofilm oluşturma yeteneği ile konak dokuların eritrosit, makrofaj, tümör nekrozis faktör, hiyaluronik asit gibi yapılarına tutunarak onları lizis etmektedir (Gilmore, 2002).

Enterokoklar sahip oldukları fenotipik ve genotipik virulans faktörleri ile insanda bakteriyemi, ürogenital ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları, gingivitis, yara ve doku enfeksiyonları ile sepsise neden olmaktadır. Aynı zamanda, Enterokok bakteriyosinleri olarak adlandırılan enterosinler sayesinde diğer pek çok Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere üstünlük sağlayarak fırsatçı patojen olarak yerini almaktadır. Bakteriyofajlar, plazmitler, transpozonlar aracılığı ve insersiyon dizileri ile Enterokok türleri arasında yatay gen transferi ve diğer bakteri grupları arasında dikey gen transferinin yapılması ile antibiyotik direnç ve virulans genleri ile aktarılabilmektedir. Bu sayede Enterokoklar, sıcaklık, pH, tuzluluk gibi çevre koşullarına karşı daha dirençli ve insanlarda enfeksiyona yol açması bakımından daha virulan özellikte olabilmektedir (Yüksel, 2012).

Enterokoklar fekal kaynaktan direkt veya indirekt yolla kontamine olmuş özellikle et, balık, süt ve süt ürünleri gibi gıda, su, toprak ve bitkilerden izole edilebilmekle birlikte sıcakkanlı hayvanların sıklıkla kan, idrar, BOS ve dışkılarından izole edilmektedir (Çetinkaya ve Elal Muş, 2010). Enterokoklar, pastörizasyon sıcaklığına dayanıklılık göstermeleri nedeniyle ısı işlem görmüş ve çiğ gıdalarda sıklıkla karşımıza çıkmakta ve bakteriyosin üretmeleri, aromatik enzim salgılamaları nedeniyle fermente gıdalarda starter kültür ve probiyotik olarak

kullanıldığında dikkat edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda gıdalarda Enterokok cinsi bakterilerin yaygınlaşmasının nedeninin gıdalardaki koruyucu madde olarak kullanılan antibiyotiklerin olduğu belirlenmiştir (Gilmore, 2002). Aynı zamanda gıdalar, hayvanlardan insanlara antibiyotik dirençli patojen Enterokokların insanlara geçişinde önemli bir etken olarak görülmektedir. Enterokoklar gen aktarımı sayesinde sahip olduğu yeni direnç genleri ile yüksek tuzluluk, sıcaklık, pH, osmotik basınç, safra ortamı gibi stres koşullarına karşı dayanıklılık göstermekte olup hem denizler başta olmak üzere sucul ekosistemlerde ve gıdalarda hem de insan doku ve organlarında üreme özelliği göstermektedir. Deniz kıyıları ve nehir yataklarından alınan su örneklerinden özellikle yaz aylarında deniz kıyılarının fekal kirlilik sonucu kontamine olduğunu ve halk sağlığını tehdit edebilecek derecede *E. faecalis* izole ettiklerini bildiren çok sayıda araştırma bulunmaktadır (Berdard, 1989; Morinigo ve diğ., 1990; Bravo ve Vincente, 1992; Gutmann ve diğ., 1994; Muñoz ve diğ., 1998; Kimiran Erdem ve diğ., 2007). Çalışmamızda da sıcaklık, tuz, pH gibi çevresel koşullar bakımından farklılık gösteren Kilyos, Rumelikavağı, Üsküdar ve Yeşilyurt denizinden alınan su örneklerinden izole edilen Enterokoklar ile çalışılmıştır.

Ülkemizde çevresel, gıda ve klinik örneklerden izole edilen Enterokokların epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar genel olarak incelendiğinde, ilk sırada *E. faecalis* (% 72.9- 80), ikinci sırada ise *E. faecium*'un (%19-25.2) izole edildiği belirlenmiştir (Çetinkaya, 2000; Kaçmaz ve diğ., 2004). Enterokokların tür tayini ile ilgili çalışmalarda, genel olarak izolatların büyük çoğunluğunun *E. faecalis* olduğu, *E. faecium* oranının daha az olduğu rapor edilmiştir (Şekercioğlu ve diğ., 1998; Torun ve diğ., 1999; Yüce ve diğ., 1999; Cömert ve diğ., 2007; Alkan ve diğ., 2016). Klinik ve çevresel örnekler ile ilgili yapılan çalışmalarda düşük oranlarda dahi olsa *E. gallinarum* suşu tespit edildiği bildirilmiştir (Etiz ve diğ., 2014; Oryaşın, 2008; Alkan ve diğ., 2016). Çalışmamızda, daha önce yapılan bir çalışmada (Kimiran Erdem ve diğ., 2007), deniz suyundan izole edilen 66 adet Enterokok suşunun API®20 Strep test kiti (Biomeriux, France) ile tür doğrulaması yapılmış ve sonucunda 46 (%69.7) suşun *E. faecalis*, 19 (%28.79) suşun *E. faecium* ve bir suşun (%1.51) *E. gallinarum* olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında, çalışmamızda da *E. faecalis* suşu *E. faecium* suşuna göre daha yüksek oranda izole edilirken sadece bir *E. gallinarum* suşu tespit edilmiştir.

Denizler, sahip olduğu kıyı şeridindeki plajlar ile turistik öneme sahip olmasının yanı sıra, deniz ürünleri açısından besin zincirinde önemli bir yere sahiptir. Aynı zamanda rekreasyonel amaçlı olarak tarım alanlarının sulanmasında, nadiren de artırılarak içme suyu olarak kullanılabilir. Artan nüfus ve sanayileşme ile birlikte özellikle metropol şehirlerde bulunan denizler ve plajlarda insanlar tarafından meydana gelen kirlilik, sanayi atıkları ve kanalizasyon suların denizlere karışması ile birlikte denizlerden izole edilen patojen mikroorganizmaların sayısında artış yaşanmaktadır. Denizler, güneş ışınlarının yüzey ve derin sulara farklı açılardan düşmesi ile aerob ve anaerob ortam gibi zengin ortamlara sahip olması, besin kaynaklarının zenginliği, geniş aralığa sahip sıcaklık ve pH değerleri, yüksek tuzluluk, osmolarite gibi faktörlerle Enterokokların üremesi için elverişli ortam oluşturmaktadır. Özellikle lağım ve kanalizasyon sularının denizlere karışması ile birlikte fekal indikatör kaynağı olarak bilinen ve insan bağırsak florasının doğal yapısında bulunan Enterokoklar, deniz sularında hızla üreyerek patojen hale gelmekte ve insanlarda enfeksiyona sebep olmaktadır. Aynı zamanda kromozomal yapılarında ya da plazmit ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile kazandıkları antibiyotik direnç genleri ve virulans faktörleri ile pek çok stres ortamlarına, antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli hale gelmekte ve tedavide güçlükler yaşanmaktadır (Savaşan ve diğ., 2008).

Denize giren insanlarda su yutma yoluyla oral boşluklar ya da diğ er vücut boşluklarından ya da dermal yolla giriş yapan, plajlarda kontamine materyallere temas ya da deniz ürünlerinin tüketilmesi ile birlikte indirekt yolla alınan Enterokoklar, sahip olduğu antijenik determinantlar ve virulans genleri ile birlikte konak immün yanıtı kaçırmakta ve konak savunma mekanizmasını önlemektedir (Muş ve Çetinkaya, 2017). Bu nedenle çalışmamızda, İstanbul'a kıyısı bulunan ve deniz ürünleri açısından önem arz eden Marmara Denizi ve Karadeniz (Kilyos, Rumelikavağı, Yeşilyurt ve Üsküdar)'den daha önceki bir çalışmadan izole edilen Enterokok suşlarının tür doğrulamasının yapılması, virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Matyar ve Dinçer, 2010 yılında İskenderun Körfezi kıyı şeridinin farklı noktalarından aldığı deniz suyu örneklerinden antibiyotik ve ağır metal dirençliliğine sahip fekal kaynaklı 158 *E. faecalis* suşu tespit etmiş ve 15 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik direnç oranlarını incelemiştir. Belirtilen çalışmada, tatlı sulardan ve deniz sularından izole edilen Enterokok suşlarındaki direnç oranları sırasıyla %32.9 ve %64.9 (eritromisin), %19.2 ve %20.8 (gentamisin), %83.6 ve %92.2 (ampisilin), %28.8 ve %31.2 (kloramfenikol), %56.2 ve %44.1

(vankomisin), %35.6 ve %49.3 (siprofloksasin), %54.8 ve %68.8 (tetrasiklin) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da benzer şekilde, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında antibiyotik direnç oranları tür içi değerlendirildiğinde sırasıyla, eritromisin için %50 ve %84.2, gentamisin için %100 ve %94.7, ampisilin için %39.13 ve %57.9, kloramfenikol için %10.86 ve %31.57, vankomisin için %41.3 ve %57.9, siprofloksasin için %17.4 ve %36.84, tetrasiklin için %52.7 ve %63.15 olarak belirlenmiştir.

Genellikle bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları ve endokardite sebep olan Enterokok cinsi bakteriler, çoklu antibiyotik direnci ve vankomisin direnci ile özellikle son 20 yılda nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde sorunlar yarattığından, Enterokok cinsi bakteriler ile ilgili çalışmaların sayısı artmıştır. İntrinsik ve ekstrinsik antibiyotik direnç mekanizmaları sayesinde Enterokoklar, konak bağışıklık yanıtından kaçmakta ve konak savunma mekanizmalarını önlemektedir. Enterokoklar, kromozomlarında ya da patojenite adalarında bulunan antibiyotik direnç yapılarının yanında, plazmit ve transpozonlar aracılı gen aktarımı ile yanlış ve fazla antibiyotik kullanımı nedeni ile de pek çok antibiyotiğe direnç geliştirmiştir (Gilmore, 2002; Yüksel, 2012).

Şentürk (2017), yaptığı çalışmada market, kasap ve pazarlardan izole ettiği 100 Enterokok izolatının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi'ne göre %100'ünün nalidiksik asite, %99'unun kanamisine, %37'sinin eritromisine, %81'inin rifampisine, %60'ının ampisiline, %34'ünün siprofloksasine, %9'unun tetrasikline, %8'inin penisilin G'ye, %3'ünün kloramfenikole, %2'sinin gentamisine karşı antibiyotik direnci saptadığını bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada kullanılan antibiyotikler çalışmamız ile benzerlik göstermekte olup çalışma sonucunda elde edilen veriler karşılaştırıldığında, çalışmamızda incelenen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında gelişen antibiyotik direnç oranlarının sırasıyla, penisilin için %60.8 ve %84.2, kloramfenikol için %10.86 ve %31.57, vankomisin için %41.3 ve %57.9, tetrasiklin için %52.7 ve %63.15, siprofloksasin için %17.4 ve %36.84, kanamisin için %97.82 ve %94.7, ampisilin için %39.13 ve %57.9, eritromisin için %50 ve %84.2, gentamisin için %100 ve %94.7 olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, deniz suyundan izole ettiğimiz 66 Enterokok suşu ile ilgili yaptığımız çalışmada, yapılan bu çalışmada olduğu gibi nalidiksik asite karşı direnç %100 oranında tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda da, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının çoklu antibiyotik direnç profiline ve farklı virulans genlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, çalışmada deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının farklı moleküler büyüklükte plazmit profiline sahip olduğu

belirlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen veriler doğrultusunda, fekal kaynaklı Enterokok bakterilerinin deniz suyuna bulaşmış olabileceği ve içerdiği plazmit profilleri ile Enterokok türleri arasında antibiyotik direnç ve virulans genlerinin yüksek oranda aktarımının gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda deniz sularında halk sağlığı problemlerine yol açan patojen Enterokokların var olduğu, bu nedenle deniz sularının fekal indikatör mikroorganizmalar açısından analizi ve rutin mikrobiyolojik kontrollerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Siprofloksasin gibi florokinon ailesinden antibiyotiklere karşı oluşan direnç, GyrA (DNA giraz alt ünitesi) ve ParC (Topoizomerez IV alt ünitesi) bölgelerinde meydana gelen mutasyonlarla ve antibiyotiğin hücre dışına atılmasını sağlayan Eflüks pompa sistemleri ile meydana gelmektedir (Klare, 2003; Li, 2005; Frye ve Jackson, 2013). Yapılan çalışmalarda kinolon grubu antibiyotiklerden olan siprofloksasin, Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanıldığından, direnç oranlarında 7 yılda ciddi bir artış olduğu (%10.3'ten %61.1'e yükseldiği) belirlenmiş ve çalışmalar yeni kuşak kinolonlar üzerine yoğunlaşmıştır (Aktepe ve diğ., 2011). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 8 (%17.4) *E. faecalis* ve 7 (%36.84) *E. faecium* olmak üzere toplam 15 (%22.72) suşun siprofloksasine dirençli olduğu, bu direnç oranının da mutasyonlar ya da bakterinin sahip olduğu Eflüks pompa sistemleri ile meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılan siprofloksasine karşı gelişen direnç, tedavide problemlere yol açmaktadır.

Enterokoklarda, kloramfenikole karşı oluşan direnç, kromozomlar ya da konjugatif plazmitlerde bulunan *cat* geninde kodlanan kloramfenikol asetil transferaz enzimi ile kloramfenikolün yapısal değişikliğe uğrayarak ribozomlara bağlanamaması sonucunda gerçekleşmektedir. Aynı zamanda hücre duvarında bulunan aktif pompa sistemlerinden olan Eflüks pompa sistemi ile kloramfenikolün hücre dışına atılımı da gerçekleşmektedir (Barbosa ve diğ., 2009). Çalışmamızda, deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının kloramfenikole direnci hem Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre fenotipik olarak hem de *catIP* geni varlığı PZR yöntemi ile genotipik olarak incelenmiştir. Fenotipik sonuçlar incelendiğinde, 66 Enterokok suşundan 5 (%10.86) *E. faecalis* ve 6 *E. faecium* (%31.57) olmak üzere toplam 11 (%16.66) suşun kloramfenikole dirençli olduğu, genotipik incelemelerde ise 33 (%71.73) *E. faecalis* ve 12 (%63.15) *E. faecium* olmak üzere toplam 45(%68.18) suşun *catIP* genine sahip olduğu belirlenmiştir. Genotipik incelemelerde,

fenotipik incelemelere göre kloramfenikol direncinin daha yüksek çıkması, kültürde bakterilerin VBNC fazına girebilmesidir. Bu nedenle özellikle virulans genlerinin incelenmesinde altın standart olarak kabul edilen fenotipik yöntemlerle özgülüğü yüksek olarak bilinen PZR yönteminin birarada kullanılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması gerekmektedir.

Enterokoklarda ribozomal korumadan sorumlu *tetM* kromozomlar üzerinde kodlanmakla birlikte Efluks pompa sistemini kodlayan *tetL* geni ile *tetQ* ve *tetN* direnç genleri ile gelişen tetrasiklin direncinin genellikle Tn916 konjugasyon transpozon yolu ile aktarıldığı belirlenmiştir (Akçimen, 2010; Hammad ve diğ., 2014). Yüksel (2012), yaptığı çalışmada 13 Enterokok izolatında *tetM* geni tespit ettiğini, *tetL* genine sahip suş izole edilmediğini bildirmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, 135 *E. faecalis*'in %95'inde *tetM* ve %17'sinde *tetL* direnç geni saptanırken, 81 *E. faecium*'un %95'inde *tetM* ve %16'sında *tetL* geni saptanmıştır (Aarestrup ve diğ., 200). Çalışmamızda, Enterokok izolatlarının tetrasiklin direnci fenotipik ve genotipik olarak incelenmiştir. Fenotipik sonuçlar incelendiğinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre, 24 (%52.7) *E. faecalis* ve 12 (%63.15) *E. faecium* olmak üzere toplam 36 (%54.54) suşun tetrasikline direnç gösterdiği saptanmıştır. Diğer yandan, tetrasiklinin ribozomlara bağlanmasını engelleyen *tetM* geni ile tetrasiklinin Efluks pompası ile dışarı atılımını sağlayan *tetL* geninin PZR yöntemi ile genotipik olarak incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 26 (%56.52) *E. faecalis*, 14 (%21.21) *E. faecium* ve 1 (%100) *E. gallinarum* olmak üzere toplam 41 (%62.12) suşun *tetM* genine, 20 (%43.47) *E. faecalis* ve 7 (%36.84) *E. faecium* olmak üzere toplam 27 (%40.9) suşun *tetL* genine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, tetrasiklin direncinin fenotipik ve genotipik analizinden elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu ve *tetM* genine sahip olan suşların sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, 66 Enterokok suşunun tetrasiklin direnci profili *E. faecalis*'te *E. faecium*'a göre daha yüksek oranda tespit edilmiş ve tetrasiklinin ribozomlara bağlanmasını engelleyen direnç geni olan *tetM*'nin Enterokok suşlarında daha yüksek oranda olduğu belirlenmiştir.

Enterokoklarda, makrolid grubu antibiyotiklerden olan eritromisine karşı gelişen direnç intrinsik olmakla birlikte genellikle konjugatif plazmit ve transpozonlar aracılığı ile ekstrinsik olarak da gelişebilmektedir (Miller ve diğ., 2014). Eritomisin direnci, 23S rRNA alt birimlerinde gerçekleşen metillenme sonucu protein sentezinin inhibe edilerek eritromisinin bağlanmasının engellenmesi, eritromisin yapısındaki lakton halkasının hidrolizi ve

eritromisinin pek çok antibiyotik gibi Efluks pompası ile hücreden atılması ile meydana gelmektedir. Eritromisin direnç geni olan *ermB*, hem kromozomlarda bulunmakta hem de Tn917 transpozonu ile aktarılabilmektedir. Eritromisin direncinden sorumlu bu transpozon, *ermB* geninin yatay ve dikey gen transferi ile hem Enterokok türleri arasında hem de diğer bakteriler arasında aktarımını sağladığından Enterokok patogenezi önemlidir (Jensen ve diğ., 1999; Wax ve diğ., 2008). Ülkemizde Enterokok patogenezi üzerine yapılan çalışmalara genel olarak bakıldığında, Enterokokların eritromisine gösterdiği antibiyotik direncinin ortalama %60 olduğu görülmektedir (Aral ve diğ., 2011; Özseven ve diğ., 2011; Etiz ve diğ., 2014). Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan eritromisine karşı direnç, yapılan bir çalışmada 153 Enterokok suşunun 131 (%83)'inde (Aral ve diğ., 2011) belirlenirken, başka bir çalışmada *E. faecalis*'te %48, *E. faecium*'da %95 olarak belirlenmiş (Özseven ve diğ., 2011) ve bir diğer çalışmada ise 536 Enterokok suşunun 445 (%83.2)'inde eritromisine direnç saptanmıştır (Etiz ve diğ., 2014). Çalışmamızda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre, 66 Enterokok izolatından 23 (%50) *E. faecalis*, 16 (%84.2) *E. faecium* ve bir (%100) *E. gallinarum* olmak üzere toplam 40 (%60.6) suşun eritromisine direnç gösterdiği belirlenmiştir. *ermB* geni hem kromozomal hem de plazmit DNA üzerinde kodlanmaktadır. Çalışmamızda 66 Enterokok suşunun 40'ında fenotipik ve genotipik olarak aynı oranda eritromisine direnç geliştiği ve bu 40 örnekten 12'sinin plazmit profiline sahip olduğu belirlenmiştir.

Son yıllarda *Enterococcus* cinsi bakterilerde, glikopeptit yapıdaki antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplanine karşı direnç geliştiği gözlemlenmekle birlikte özellikle nozokomiyal Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde sorun yaratmaktadır. Vankomisine dirençli Enterokok (VRE) suşlarının yüksek oranda artışının sebebi olarak mutasyon ve kromozom anomalileri ile konjugatif plazmitler, transpozonlar aracılığı ile gen aktarımının gerçekleştiği düşünülmektedir (Çetinkaya ve diğ., 2000; Yüksel, 2012). Yapılan çalışmalarda fenotipik ve genotipik virulans faktörleri olarak glikopeptid dirençli Enterokokların sayısında artış olduğu ve özellikle vankomisin direnç genlerinin Enterokok türleri ve diğer Gram pozitif bakteriler arasında plazmit ve transpozonlar ile aktarıldığı belirlenmiş ve Enterokok olgularının tedavisinde güçlükler yaşanmaya başlanmıştır (Leclercq ve diğ., 1989; Woodford ve diğ., 1997; Çöleri ve Çökmüş, 2008).

Vankomisin dirençli Enterokok suşları, Dünya'da ilk kez 1986 yılında İngiltere, Fransa ve ABD'den bildirilmiş olmakla birlikte, ülkemizde 1998'de Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde

yenidoğan bir bebeğin plevra sıvısından izole edilmiştir (Vural ve diğ., 1999; Sood ve diğ., 2008; Işıkgöz Taşbakan, 2010). 1990 yılında Newyork City Hastanesi'nde izole edilen vankomisine dirençli Enterokok (VRE) sayısının 2 yıl içinde %53 arttığı saptanmıştır (Mato ve diğ., 1996). Iraz ve diğ. (2012). Çalışmada, 79 hastadan izole edilen Enterokok bakterilerinden nozokomiyal kaynaklı 31 ve perirektal sürüntü kaynaklı 30 VRE suşu tespit edilmiştir (Akçimen, 2010). Yapılan bir çalışmada 536 hastanın idrar kültüründen izole edilen Enterokok suşlarının %14.7'sinin (Etiz ve diğ., 2014), Dicle Üniversitesi'nde yapılan başka bir çalışmada 699 rektal sürüntüden izole edilen Enterokok suşlarından 82 (%75.9) *E. faecium*, 6 (%5.6) *E. faecalis* ve 20 (18.5) *Enterococcus* spp. suşu olmak üzere toplam 108 örneğin (İpek, 2015), Küba'da yapılan diğer bir çalışmada ise 50 Enterokok izolatının %50'sinin vankomisine dirençli olduğu (Medell ve diğ., 2014) belirlenmiştir. Benzer çalışmalarda, 189 perirektal sürüntüden 101 (%53)'inde (Landman ve diğ., 1996) ve 197 rektal sürüntü kültüründen 5 (%2.5)'inde (Ceryan ve diğ., 2000) VRE tespit edilmiştir. Oryaşın, 2008 yılında Aydın'da yaptığı çalışmada, Büyük Menderes Nehri ve nehir suyuyla beslenen kanal suları, kanal suları ile beslenen toprak örnekleri, arıtım tesisi suları, hayvan kesim yerindeki rektum ve çekum örnekleri, havuz suyu örnekleri, çöp taşıma kamyonlarındaki çöp sızıntı sularından aldığı çevresel örneklerden izole ettiği 50 Enterokok suşundan 4 (%8)'ünün vankomisine dirençli olduğunu tespit etmiştir. Sánchez Valenzuela ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada, hayvansal ve bitkisel kaynaklı gıda ürünleri ve sulardan izole edilmiş 55 Enterokok suşundan *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının vankomisine direnç oranlarını sırasıyla %7.14 ve %4.87 olarak saptamıştır. Kanada'da ve Avustralyada Enterokok epidemiyolojisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmada, üriner sistem enfeksiyonlu ve bakteriyemili hastalardan izole edilen VRE izolatlarının oranları sırasıyla, *E. faecalis*'te %1.7 ve %5, *E. faecium*'da %98.3 ve %70 olarak belirlenmiştir (Peel ve diğ., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere yanlış ve fazla antibiyotik kullanımı ile plazmit ve transpozonlar ile gen aktarımının yüksek sayıda olması nedeniyle vankomisin direncinde artış görülmüş ve çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda vankomisin direnci gösteren suşların diğer antibiyotiklere de yüksek oranda direnç gösterdiğinin belirlendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda, 19 (%41.3) *E. faecalis* ve 11 (%57.9) *E. faecium* olmak üzere toplam 30 (%45.45) Enterokok suşunun fenotipik olarak vankomisin direncine sahip olduğu belirlenmiş ve çalışmamızda da diğer çalışmalara benzer olarak ve halk sağlığı problemlerine neden olacak şekilde yüksek oranlarda vankomisin direnci saptanmıştır.

Glikopeptit yapılu vankomisin ve teikoplanin direncinden sorumlu *vanA* geni ve sadece vankomisin direncinden sorumlu *vanB* geni Enterokok kromozomlarında bulunarak vankomisine karşı intrinsik direnç geliştirebildiği gibi aynı zamanda Tn1546 ve Tn5382 konjugatif transpozonları ve plazmitlerle de aktarımıyla ekstrinsik direnç de geliştirebildiği belirlenmiştir (Gilmore, 2002; Klare, 2003; Çiçekler Tok, 2006; Williams ve Hergenrother, 2008). Kaleli ve diğ. (2017), 674 rektal sürüntüden izole ettikleri Enterokok cinsi bakterilerin *vanA* ve *vanB* direnç genleri real time PZR yöntemi ile araştırılmış, çalışma sonucunda 67 (%10)'ünde *vanA*, 25 (%3.7)'inde *vanB*, 1 (%0.1)'inde ise *vanA* ve *vanB* direnç genlerine rastlanmıştır.

Et, kabuklu deniz ürünleri ve çevresel örnekler ile yapılan çalışmalarda, Lopez ve diğ. (2009) 229 Enterokok izolatından 31 (%13.5)'inin *vanA* genine sahip olduğunu tespit etmiş, benzer şekilde Messi ve diğ. (2006) 59 izolattan %10.7'sinin *vanA*, %8'inin *vanB* ve %16'sının *vanC* genine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kutluk (2018), 7551 hastadan izole ettiği Enterokok suşundan 107'sinde vankomisin direnç genleri araştırmış ve 96 (%89.72) örneğin *vanA*, bir (%0.93) örneğin ise *vanB* direnç genine sahip olduğunu bildirmiştir. 49 klinik merkezinin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, 4208 Enterokok izolatından 18'inde *vanA*, 5'inde *vanB* ve 28'inde *vanC* direnç genine rastlanmıştır (Schouten ve diğ., 2000). Yapılan çalışmalarda, patojen Enterokoklarda son yıllarda sıklıkla görülen *vanA*'nın vankomisin ve teikoplanin olmak üzere her iki antibiyotik direncinden, *vanB*'nin ise sadece vankomisin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiş ve Dünya geneline bakıldığında Enterokok izolatlarında *vanA* direnç genine daha fazla rastlandığı belirlenmiştir (Kawalec ve diğ., 2001; Sun ve diğ., 2012). Çalışmada da son yıllarda özellikle ekstrinsik direnç mekanizmalarıyla direnç gelişen ve Enterokok epidemiyolojisinde önemli olan vankomisin direnç genlerinden *vanA* ve *vanB* ile çalışılmıştır.

Enterokoklar, gıda, su, toprak ve bitki kaynaklı olmasının yanı sıra sıcakkanlı hayvanların rektal yollarında da sıklıkla bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 100 pet köpeğinden oral, nasal ve rektal yapılardan alınan 300 sürüntü örneğinde 51 Enterokok izole edilmiş ve bu türlerin çevreye yayılabildiği, insanlardan alınan örneklerde özellikle vankomisine dirençli Enterokok suşlarında rastlanan Tn1546 transpozuna, köpeklerden alınan örneklerde de rastlandığı belirlenmiş ve virulans faktörlerinin cinsler arasında da aktarımının yapılabildiği sonucuna varılmıştır (Rodrigues ve diğ., 2002; Herrero ve diğ., 2004; Ghosh ve diğ., 2011). Yapılan çalışmalar ile benzer şekilde çalışmamızda da, 66 Enterokok suşundan 15 (%32.6)

E. faecalis ve 6 (%31.57) *E. faecium* olmak üzere toplam 21 (%31.81) suşun *vanA* genine, 10 (%21.73) *E. faecalis* ve 6 (%31.57) *E. faecium* olmak üzere toplam 16 (%24.24) suşun *vanB* direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada, %49.09 örneğin en az 3 antibiyotiğe dirençli olup *E. faecalis*'in %57'sinin ve *E. faecium*'un %46'sının çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu tespit edilmiş ve vankomisin direncinin çoklu antibiyotik direnci ile ilişkisi olabileceği rapor edilmiştir. Çalışmamız genel olarak değerlendirildiğinde 66 Enterokok suşununun 30 (%45.45)'sinin fenotipik olarak, 37 (%56.06)'sinin genotipik olarak benzer oranlarda vankomisin direnci gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçların yanısıra, çalışmamızda, plazmit profiline sahip Enterokok suşlarının vankomisin direncine sahip suşlar ile aynı olduğu belirlenmiş ve vankomisin direncinden sorumlu genin plazmitler ile aktarımının yapılmış olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız ayrıca vankomisine direnç gösteren *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* suşlarının 13 farklı antibiyotikten en az 6 en fazla 11 antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği saptanmış ve özellikle plazmit aracılı aktarılan vankomisin direncinin çoklu antibiyotik direncine de sebep olabileceği sonucuna varılmıştır.

Enterokoklarda, son yıllarda artış gösteren yüksek düzey aminoglikozit direnci (YDAD), mutasyonlar ve aminoglikozit modifiye edici enzimlerin salgılanmasıyla meydana gelmektedir. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre, Enterokok cinsi bakterilerde yüksek düzey aminoglikozit direncini (YDAD) saptamak için yapılan çalışmalarda direnç oranlarını, Esen ve diğ. (2001) %43, Gökahmetoğlu ve diğ. (1999) *E. faecalis*'te %33 ve *E. faecium*'da %71, Miroviç ve diğ. (2000) *E. faecalis*'te %52 ve *E. faecium*'da %68, Toutoza ve diğ. (2001) *E. faecalis*'te %28 ve *E. faecium*'da %47 olarak tespit etmiştir. Aktepe ve diğ. (2011) yılında hastalardan izole edilen 137 Enterokok suşu ile yaptıkları çalışmada, %44.5'inin streptomisine, %46'sının gentamisine dirençli olduğu belirlenmiş ve aynı hastanede 7 yıl önce yapılan bir çalışmaya göre özellikle gentamisin direncinde artış (%10.8'den %46'ya yükselme) olduğu belirlenmiştir. Enterokoklarda gentamisin ve streptomisin direnci ile ilgili yapılan çalışmalarda yüksek düzey gentamisin direnci (YDGD) ve yüksek düzey streptomisin direnci (YDSD) bulunmuştur. YDGD üzerine yapılan çalışmalarda direnç oranları, bir çalışmada tüm izolatlarda %29 (Çiçek ve diğ., 2006), diğer bir çalışmada *E. faecalis* suşunda %13 ve *E. faecium* suşunda %41 (Meriç ve diğ., 2004), başka bir çalışmada *E. faecalis* suşunda %14 ve *E. faecium* suşunda ise %52 (Mert Dinç ve diğ., 2009) olarak belirlenmişken, Şamlıoğlu ve diğ. (2011) ve Iraz ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada YDGD oranlarını sırasıyla *E. faecalis* suşunda %18 ve %42, *E. faecium* suşunda %93 ve %69 olarak

belirlemişlerdir. Diğer yandan, Çiçek ve diğ. (2006) tüm Enterokok izolatlarının %38'inde YDSD tespit etmişken, Meriç ve diğ. (2004), Mert Dinç ve diğ. (2009) ve Iraz ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmalarda YDSD oranlarını sırasıyla *E. faecalis*'te %22, %11 ve %44 ve *E. faecium*'da %67, %61.5 ve %79 olarak saptamışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, YDGD gösteren suşların aynı zamanda ampisiline de direnç geliştirdiği belirlenmiş ve Enterokoklar geliştirdikleri bu direnç mekanizması ile Enterokok bakterileri ile enfekte olmuş bireylerde sinerjistik etki oluşturmak amaçlı kullanılan antibiyotik tedavisine yanıt vermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda, deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun aminoglikozit grubu antibiyotiklerden streptomisin, kanamisin ve gentamisin direnci fenotipik ve genotipik olarak incelenmiştir. Çalışmamız sonucunda 46 (%100) *E. faecalis*, 18 (%94.73) *E. faecium* ve bir (%100) *E. gallinarum* olmak üzere toplam 65 (%98.48) suşun fenotipik olarak gentamisin direncine sahip olduğu ve 45 (%97.82) *E. faecalis*, 18 (%94.97) *E. faecium* olmak üzere toplam 63 (%95.45) suşun kanamisine direnç gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda yüksek düzey gentamisin ve kanamisin direnci saptanırken, çalışmada incelenen suşların hepsinin fenotipik ve genotipik olarak streptomisin direncine sahip olmadığı belirlenmiş ve çalışmamızın ilgi çekici sonuçlarından biri olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda, yüksek oranda gentamisin ve kanamisin direncinin gelişmesi, Enterokok kromozomlarında meydana gelen mutasyonlar ya da plazmitler ile gen aktarımı sayesinde olabileceği düşünülmektedir.

Aminoglikozitlere gelişen dirençten aminoglikozit modifiye edici enzimleri kodlayan genler *aac(6')-aph(2'')* (gentamisin direnç geni), *ant(6)-la* (streptomisin direnç geni) ve *aphA3* (kanamisin direnç geni) genleridir. Yapılan çalışmalarda, *aac(6')-aph(2'')* genine sahip Enterokok yüzdelerini, Yüksel (2012) *E. faecalis*'te %26, Kobayashi ve diğ. (2001) %42, Aarestrup ve diğ. (2000) %100 olarak tespit ederken, *E. faecium* suşunda sırasıyla %9, %4.3 ve %100 olarak bulmuşlardır. Yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* izolatlarının %91'inin, *E. faecium* izolatlarının %72'sinin *aphA3* genine sahip olduğu belirlenmiştir (Aarestrup ve diğ., 2000). Yapılan çalışmalarda, *aac(6')-aph(2'')* geninin gentamisin, kanamisin, tobramisin, sisomisin direncinden, *aphA3* geninin ise streptomisin, kanamisin ve amikasin direncinden sorumlu olduğu ve her iki genin de yüksek düzey aminoglikozit direncine ve çoklu antibiyotik direncine neden olduğu belirlenmiştir (Kobayashi ve diğ., 2001; Yüksel, 2012). Çalışmamızda, aminoglikozit grubu antibiyotiklerden streptomisin, kanamisin ve gentamisin direncinden sorumlu olan virulans genleri PZR yöntemi ile incelenmiş ve çalışma

sonucunda, 46 (%100) *E. faecalis*, 18 (%94.73) *E. faecium* olmak üzere toplam 64 (%96.96) suşun *acc(6')-aph(2'')* genine, 45 (%97.82) *E. faecalis* ve 17 (%89.47) *E. faecium* olmak üzere toplam 62 (%93.93) suşun *aphA-3* genine sahip olduğu belirlenmiş ve fenotipik sonuçlar ile benzerlik göstermiştir. Çalışmamız sonucunda, diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstererek *acc(6')-aph(2'')* geni ile *aphA-3* geninin sinerjistik etki oluşturarak yüksek düzey aminoglikozit direncine neden olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer çalışmaların sonuçlarından farklı olarak, tüm suşların fenotipik incelemelerde streptomisin duyarlı olduğu ve genotipik olarak da streptomisine direnci kodlayan *ant(6)-Ia* genine sahip olmadığı saptanmıştır. Aynı zamanda streptomisinin çalışmada incelenen Enterokok suşlarının hücre duvarına bağlanma affinitesinin yüksek olduğu, hücre duvarı porlarından kolaylıkla geçebildiği ve aminoglikozit modifiye edici enzimlerden streptomisine özgü enzimlerin salgılanmadığı düşünülmektedir.

Rifampisin, bakteri RNA polimerazının β -alt ünitesine bağlanarak etki göstermektedir. Son yıllarda giderek artan rifampisin direncinin, fazla antibiyotik kullanımı ve rifampisin direncinden sorumlu *rpoB1* ve *rpoB2* genlerindeki mutasyonlar sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (Enne ve diğ., 2004). Çalışmamızda, deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunda rifampisin direnci fenotipik ve genotipik olarak incelenmiş, tüm suşların fenotipik olarak direnç geliştirdiği ve *rpoB1* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bir (%2.17) *E. faecalis* suşu hariç tüm suşların *rpoB2* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. *rpoB1* ve *rpoB2* geninin her ikisi rifampisin direncinden sorumlu olup sadece bir suşun *rpoB2* genine sahip olmadığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin ise yapılan başka bir çalışmadan (Toprak Ülger ve diğ., 2011) elde edilen sonuca benzer şekilde, bazı direnç genlerinin kromozomal DNA'da kodlanırken mobil genler (IS elementleri) varlığında daha fazla eksprese edilirken, mobil genler olmadığında 'sessiz genler' olarak kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Enterokoklar ve diğer Gram pozitif bakteriler arasında antibiyotik direnç ve virulans genlerinin aktarımı, genellikle transpozon ve konjugasyon yolu ile gerçekleşirken, konjugasyonda verici hücreler ile alıcı hücreler arasında peptid yapılı hormonların salgılanması, seks feromonlarının varlığı ve yüzey adezyon proteinleri ile agregasyon faktörünün salınması ile bu genlerin aktarımının 1000 kat daha arttığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda seks feromonlarına sahip olan bakterilerin β -hemoliz özelliğine de sahip olduğu belirlenmiştir (Leclercq ve diğ., 1989). Gıda örneklerinden izole edilen Enterokok suşları ile

ilgili yapılan bir çalışmada, izolatların hemoliz aktivitesi değerlendirilmiş, 140 suşun α -hemolitik, 12 suşun β -hemolitik ve 13 suşun γ -hemolitik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Şentürk, 2017). Çalışmamızda, tüm suşların hemoliz aktivitesine sahip olduğu ve β -hemoliz reaksiyon gösterdiği, bu izolatlardan 16'sının plazmit içerdiği de belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda diğer çalışmalara benzer şekilde, hemolitik aktivite gösteren Enterokok suşlarından 24 (%36.36)'ünün *cpd*, 26 (%39.4)'sının *ccf* ve 38 (%57.57)'inin *cob* seks feromonlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda yapılan çalışmalara benzer şekilde Enterokok suşlarının türe göre α , β ve γ hemoliz aktivitesine sahip iken sadece tek bir hemoliz aktivitesine sahip suşların bulunmasının sebebinin türler arası hemolitik aktivitenin aktarımında β -hemolitik aktiviteden sorumlu genin baskın genler arasında olabileceği düşünülmektedir.

Enfeksiyon oluşum sürecinde, ilk aşama konak hücreye tutunma ve kolonizasyondur. Kolonizasyondan sonra biyofilm oluşumu gerçekleşir. Biyofilm yapısı sayesinde bakteriler, konak hücrenin bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere dirençli hale gelen bir savunma sistemi oluşturarak konakta enfeksiyona sebep olurlar (Costerton ve diğ., 1999).

İnsan bağırsak florasının doğal yapısında bulunan Enterokoklar, gastrointestinal ve üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar, yara ve doku enfeksiyonları ve yenidoğan sepsisine sebep olmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda Enterokokların tükürük ve dışeti yapısından da izole edildiği ve oral yapıda biyofilm oluşturarak enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmesi ilgi uyandırmıştır (Lowe ve diğ., 1995; Kayaoglu ve diğ., 2004; Dahlén ve diğ., 2011). Yapılan bir çalışmada, oral örnek alınan 240 bireyin %40 (16.6)'ında *E. faecalis* suşu tespit edilmiş ve bu suşların fenotipik ve genotipik virulans faktörleri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda izole edilen *E. faecalis* suşlarının %100'ünün biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu, %92'sinin lipaz, %38'inin hemoliz, %39'unun jelatinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Komiyama ve diğ., 2016). Bigeç, 2015 yılında yaptığı tatlı su ve deniz suyundan toplanan 100 balık örneğinden izole edilen Enterokok suşlarının jelatinaz, hemoliz aktivitesi, biyofilm oluşturma kapasitesini incelemiştir. Biyofilm oluşturma sonuçları incelendiğinde 100 izolattan %18.7'sinin kuvvetli, %52.7'sinin orta, %24'ü zayıf biyofilm oluşturma kapasitesine sahipken %9.3'ünün biyofilm oluşturmadığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada 100 Enterokok suşundan 19 (%12.7)'unun jelatinaz ve 3 (%2)'ünün hemoliz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, yapılan çalışmalara benzer şekilde, deniz suyundan izole edilen

66 Enterokok suşunun jelatinaz, kazeinaz, biyofilm oluşturma kapasitesi, serum direnci ve hemaglutinasyon aktivitesi fenotipik olarak incelenmiş ve *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında sırasıyla 42 (%91.3) ve 18 (%94.7), 31 (%67.4) ve 6 (%31.57), 19 (%41.3) ve 9 (%47.36), 24 (%52.7) ve 6 (%31.57), 15 (%32.36) ve 0 (%0) olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, *E. faecalis* suşunun *E. faecium*'a göre daha yüksek oranda virulans faktörüne sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, diğer yapılan çalışmalara benzer şekilde, 66 Enterokok suşundan 28'inin kuvvetli biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu, bu suşların da 25'inin aynı zamanda jelatinaz ve hemolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda, biyofilm oluşturma kapasitesinin bakterilerin konak doku ve kolonizasyonunda etkili olarak konak dokulara zarar veren jelatinaz enzimin salgılanması ve hemolitik aktivitenin artışında etkili olduğu düşünülmektedir (Bigeç, 2015; Komiyama ve diğ., 2016).

Bakteriyosinler, özellikle laktik asit bakterileri tarafından üretilen ve ısıl işlem görmüş ve paketli gıdalarda muhafaza olarak kullanılan ve Gram pozitif bakteriler başta olmak üzere diğer pek çok Gram negatif bakteri üzerinde de antimikrobiyal etkisi olan protein yapıdaki maddelerdir (Upadhyaya, 2009). Lantibiyotik grubuna dahil olan ve Enterokoklar tarafından üretilen bakteriyosinler olan enterosinler, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringens* bakterilerinin yanı sıra pek çok Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı litik aktivite göstererek özellikle gıdalarda starter kültür olarak ve probiyotik olarak kullanılmaktadır (Tagg ve diğ., 1976; Klaenhammer, 1993; Nes ve diğ., 2007; Yüksel, 2012). Yapılan bir çalışmada, 48 Enterokok suşunun agar difüzyon yöntemine göre indikatör olarak kullanılan *Micrococcus luteus* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (van Belkum ve Stiles, 2000; Line ve diğ., 2008; Yüksel, 2012). Yapılan çalışmalarda, *E. faecalis*'in *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli*'nin üremesini inhibe ettiği (Sarika ve diğ., 2011), *E. faecium*'un ise *L. monocytogenes*, *B. cereus* ve *Streptococcus bovis*'un üremesini inhibe ettiği (Marekova ve diğ., 2003) belirlenmiştir. Çalışmamızda, deniz suyundan izole edilen Enterokokların, Gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve Gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı geliştirdiği bakteriyosin aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda 15 (%32.6) *E. faecalis* ve bir (%5.26) *E. faecium*'un *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine, 11 (%23.4) *E. faecalis*'in ise *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamız sonucundan elde edilen bu veriler doğrultusunda,

Enterokok suşlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere antimikrobiyal etki göstermesi, rekabetçi florada ve diğer patojen bakterilere karşı litik aktivite göstererek çevresel ortamlarda avantaj sağlayabileceği ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla beraber, Enterokok suşlarının pek çok antibiyotiğe direnç geliştirmesi ve virulans faktörlerine sahip olması nedeniyle antibakteriyel aktiviteye sahip olsa bile Enterokokların gıda koruyucu olarak kullanımlarında sorun teşkil edebileceğini göstermektedir.

Endokardit olgularında sıklıkla tespit edilen kollajen, jelatin ve hemoglobini lizis eden jelatinaz enzimi bakteri kromozomlarında *gelE* geni üzerinde kodlanmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009). Enterokok cinsi bakterilerde *gelE* geninin PZR yöntemi ile incelenmesine yönelik çalışmalarda, sebzeden izole edilen suşların %45.5'nde, sulardan izole edilen suşların %33.3'nde (Abriouel ve diğ., 2008), insan ve hayvanlardan izole edilen suşların %20.5'nde (Gülhan ve diğ., 2005), mastisitli sığır sütlerinin %30.7'sinde (Gültekin, 2015), et ve süt ürünlerinden izole edilen suşların %10'unda, klinik izolatlardan elde edilen suşların %15'de (Torlak, 2013) jelatinaz aktivitesinden sorumlu *gelE* geni tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, klinik, gıda ve sulardan sıklıkla *gelE* genine sahip Enterokok suşlarının izole edildiği bildirilmiştir (Eason ve Gasson, 2001, Lanthier ve diğ., 2010). Yapılan bir çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 85 Enterokok suşunun %55'inde ve çoklu antibiyotik direnci gösteren suşların %39'unda *gelE* geni tespit edilmiştir (Shahraki ve Mousavi, 2017). Benzer çalışmalarda, vankomisin direncine sahip Enterokok izolatlarının %70'inde (Sabia ve diğ., 2008) ve %7.9'unda (Sharifi ve diğ., 2012) aynı zamanda *gelE* geni de gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, 66 Enterokok suşundan 42 (%91.3) *E. faecalis*, 18 (%94.7) *E. faecium* ve bir (%100) *E. gallinarum* olmak üzere toplam 61 (%92.42) suşun fenotipik olarak jelatinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, incelenen suşlardan 42 (%91.3) *E. faecalis* ve 17 (%89.4) *E. faecium* olmak üzere toplam 59 (%89.4) suşun jelatinaz üretiminden sorumlu *gelE* genine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarla benzer şekilde, *gelE* genine sahip suşların aynı zamanda vankomisin direncine de sahip olduğu belirlenmiştir.

Enterokoklarda AS-48 olarak adlandırılan agregasyon maddesi, *asal* ya da *agg* geni tarafından kodlanmaktadır. Özellikle konak dokunun renal tübüler ve endokardiyal hücrelerine tutunarak biyofilm oluşmasında görev alan ve feromon ile salınımı uyarılan bir yüzey proteindir. Diğer bir yüzey proteini olan Esp'nin ise Enterokok bakterilerinin özellikle idrar yolu epitel hücrelerine tutunmasında ve biyofilm oluşumunda görev aldığı bildirilmiştir

(Sava ve diğ., 2010). Klinik izolatlar ve gıda örnekleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, Enterokok suşlarının *esp* genine sahip olma oranlarının farklılık gösterdiği ve klinik örneklerde daha yüksek oranda tespit edildiği belirlenmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Hallgren ve diğ., 2009; Baylan ve diğ., 2011; Gültekin, 2015). Bakteri kromozomlarında kodlanan ve hücre yüzeyinde yer alan, konak immün sistemden kaçışta ve biyofilm oluşumundan sorumlu virulans faktörü olan *esp* geni ile yapılan çalışmalar incelendiğinde *esp* genine sahip suşların çoğunun *agg* ya da *asa1* geni ile çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu belirlenmiştir (Upadhyaya ve diğ., 2009; Gültekin, 2015). Eaton ve Gasson (2001), klinik *E. faecalis* izolatlarının %44'ünde, gıdadan izole edilen *E. faecalis*'in %33'ünde *esp* geni varlığını bildirmişlerdir. Baldassari ve diğ. (2004) yaptıkları çalışmada *vanA* genine sahip *E. faecalis* suşlarında *asa1* genine de rastlamışlardır. Bir diğer çalışmada 85 Enterokok izolatından çoklu antibiyotik direnci gösteren Enterokok izolatlarının %61'inde ve tüm izolatların %69'unda *asa1* geni tespit edilmiştir (Shahraki ve Mousavi, 2017). Özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde bulunduğu belirlenen *esp* geni ile ilgili yapılan çalışmalarda, çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların görülme sıklığının daha fazla olduğu belirtilmiştir (Creti ve diğ., 2004). Coque ve diğ. (2002) yaptıkları çalışmada, *esp* geninin çoklu antibiyotik direnci görülen izolatlarda daha sık gözlemlendiğini ve ampisilin, eritromisin ve siprofloksasin direncine sahip bölgeler içerdiğini bildirmişlerdir. Waar (2004) yılında, karaciğer nakli olan ve gönüllü sağlıklı bireylerden aldıkları dışkı ve kan kültürlerinden izole ettikleri toplam 133 Enterokok suşunun virulans faktörlerini PZR yöntemi ile genotipik olarak incelemiştir. Çalışma sonucunda, karaciğer nakli olan hastalarda %71, dışkı örneklerinde %40, kan kültürlerinde %45 olmak üzere *esp* geni gözlemlenmiştir. *gelE* ve *asa373* gen yüzdeleri ise sırasıyla, karaciğer nakli olan hastalarda %32 ve %15, dışkı örneklerinde %66 ve %6 olarak saptanmış, kan kültür örneklerinde ise *asa373* geni %5 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada, virulans faktörleri kıyaslandığında, *esp* ve *asa1* gen varlığına sahip olan izolatların tümünün *asa373* genine de sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda virulans faktörleri incelenen ve deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarından 39 (%84.7) *E. faecalis* ve 11 (%57.9) olmak üzere toplam 50 (%75.75) suşun *agg* genine sahip olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda, *agg* geninin Enterokok virulansından sorumlu diğer genler ile virulansta sinerjistik etki oluşturduğu ve ortak direnç determinantlarının aktarımında görevli olduğu saptanmıştır (Wardal ve diğ., 2014; Hashem ve diğ., 2015). Çalışmamız sonucunda diğer çalışmalarla benzer şekilde, *agg* genine sahip Enterokok suşlarının vankomisin direnci ve çoklu antibiyotik direncine de sahip olduğu ve plazmit aracılı direnç aktarımından sorumlu

seks feromon genlerini (*cpd*, *ccf* ve *cob*) de içerdği belirlenmiştir. Bu bulgu, Eaton ve Gasson (2001)'un, agregasyon geni içermeyen Enterokok suşlarında seks feromon determinantlarının bulunabileceğini, agregasyon geni içeren suşlarda ise mutlaka seks feromon determinantlarının bulunduğunu belirten çalışmanın bulguları ile uygunluk göstermektedir. Seks feromonları virulans faktörleri olarak değerlendirilmemekle birlikte, üretiminin virulans faktörlerinin ve antibiyotiklere direncin konjugatif plazmit aracılığı ile diğer Enterokok suşlarına yayılmasını sağlayarak virulans özelliklerinin artmasını sağlaması açısından önem kazanmaktadır.

Konak dokulara tutunmada görevi olan ve Enterokokların hücre yüzey adezyon proteini olan *Enterococcus* yüzey antijen A proteinin kodlanmasından sorumlu genler *efaAfs* ve *efaAfm*'dir. Gıdalar ve klinik örneklerden izole edilen Enterokok suşları ile yapılan çalışmalarda, virulanstan sorumlu *efaAfm* genine sahip suş oranını, Shoeili ve diğ. (2014) %100, Tuncer ve Inoğlu (2013) %75, Eaton ve Gasson (2001) gıdada %82, klinik örneklerde %100, Gültekin (2015) %69.2 olarak bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda da adezyondan sorumlu *efaAfs* ve *efaAfm* oranları sırasıyla *E. faecalis* için 44 (%95.6) ve 27 (%58.7) ile *E. faecium* için 0 (%0) ve 12 (%63.1) olarak belirlenmiş ve suşların %66.66'sının *efaAfs* genine, %59.09'unun *efaAfm* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, diğer çalışmalara benzer şekilde *efaAfs* geninin sadece *E. faecalis* izolatlarında bulunduğu ve adezyon proteinlerinin genel olarak *E. faecalis*'te daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamız genel olarak değerlendirildiğinde tüm verilerden elde edilen fenotipik ve genotipik virulans faktörlerinin *E. faecalis*'te daha yüksek olduğu ve enfeksiyonun ilk basamağı olan konak tutunma ve kolonizasyonunda *E. faecalis* suşlarının daha virulan olduğu belirlenmiştir.

Enterokok patogeneğinde önemli olan virulans faktörlerinden biri de hücre dışı matriks proteinlerine ve kollajen bağlamada görev alan *ace* ve *acm* genleridir. *Ace*, *Staphylococcus aureus*'un kollajen bağlayıcı proteinine benzeyen ve kollajen tip I ve IV ile laminin ve dentine bağlanmada görev alan protein yapısıdır. *E. faecalis* türünde daha sıklıkla gözlemlenen bu genin aynı zamanda konak dokulara kolonizasyon ve biyofilm üretiminde önemli olduğu bildirilmiştir. PZR yöntemi ile *ace* geninin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda, Medeiros ve diğ. (2014) klinik örneklerden izole edilen Enterokok bakterilerinin %73.7'sinde, Shahraki ve Mousavi (2017) ise 85 Enterokok izolatının %40'ında *ace* geni gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde, hücre dışı matriks proteinlerine ve

kollajene bağlanmada görev alan *ace* geni oranının %60.6 olduğu ve sadece *E. faecalis* suşlarında bulunduğu saptanmıştır.

Hemolizin/sitolizin, insan, at, koyun ve tavşan eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren toksin yapıdaki virulans faktörüdür. Genellikle klinik örneklerde endokarditli hastalardan izole edilmekle birlikte diğer Gram pozitif bakterilere karşı bakteriyosin aktivitesi gösterdiği de bildirilmiştir. Sitolizin operonu bakteri kromozomları üzerinde bulunmakta ya da plazmitlerle aktarılmaktadır. Sitolizin üretiminden sorumlu birincil gen olan *cylA* geninin peptit salınımını uyararak diğer sitolizinden sorumlu genlerin aktivitesinden ve hemolitik toksin üretiminden sorumlu olduğu bilinmektedir (Cox ve diğ., 2005; Morandi ve diğ., 2006). Yapılan bir çalışmada, üriner sistem enfeksiyonlu hastadan izole edilen Enterokok suşlarının %14.1'inde *cylA* geni tespit edilmiştir (Shahraki ve Mousavi, 2017). Diğer bir çalışmada ise Enterokok suşlarının hemolizin aktivitesi fenotipik olarak kanlı agarda tüm izolatların %39'unda belirlenirken, genotipik incelemede tüm izolatların %5'inde *cylA* geni saptanmıştır (Banerjee ve Anupurba, 2015). Çalışmamızda, diğer çalışmalara benzer şekilde, incelenen tüm suşların β-hemolitik aktiviteye ve sitolizin üretiminden sorumlu genlere (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) sahip olduğu belirlenmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bakterilerin kromozomal olarak sahip olduğu ya da plazmit aracılı gen aktarımı ile ekstrinsik olarak kazandığı antibiyotik direnç genleri ya da virulans genleri arasında sinerjistik bir etki yarattığı ve patogeneze önemli olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, özellikle sitolizin üretiminden sorumlu *cyl* geni, biyofilm üretiminden sorumlu *esp* geni, agregasyon faktörü ve konağa tutunmadan sorumlu olan *agg* ya da *asa* geninin birlikte bulunması konak dokuya tutunma ve biyofilm oluşumunda önemli olduğu, Enterokok virulanslığını arttırdığı ve aynı zamanda eritromisin, yüksek düzey aminoglikozit direnci ve en önemlisi vankomisin direncinde artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Yüksel (2012), peynirlerden izole edilen 48 Enterokok cinsi tanımlamış, örneklerin virulans faktörlerini fenotipik ve genotipik olarak incelemiş ve örneklerde plazmit profillerini belirlemeye çalışmıştır. Aynı çalışmada, Enterokok suşlarının *agg*, *esp*, *ace*, *efA*, *gelE*, *fsr*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cpd*, *cob* ve *ccf* virulans genleri PZR yöntemi ile belirlenmiş ve *E. faecalis*'in *E. faecium*'a göre daha fazla virulans genine sahip olduğu saptanmıştır. Çalışmamız ile benzerlik gösteren bu çalışma ile çalışmamız sonuçları karşılaştırıldığında, tür içi virulans gen oranları sırasıyla, *ace* geni için %86.9 ve %0, *gelE* geni için %91.3 ve %89.4, *efaAfs* için %95.6 ve %0, *efaAfm* için %58.7 ve %63.1, *cpd* geni için %41.3 ve %26.3, *ccf*

geni için %30.4 ve %63.1, *cob* geni için %56.5 ve %63.1, *agg* geni için %84.7 ve %57.9, *fsr* geni için %60.8 ve %63.1 olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara benzer şekilde, çalışmamızda da suşların tamamının hemolizin/sitolizin üretiminden sorumlu genlere (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) ve aynı zamanda çoklu antibiyotik direnç genleri ve virulans genlerine de sahip olduğunun saptanması *agg* ve *gelE* gibi sitolizin üretiminden sorumlu genlerin de diğer virulans faktörlerinin gelişimine katkı sağladığı görüşünü desteklemektedir.

Shahraki ve Mousavi (2017) yaptıkları çalışmada, İran'da bir hastanedeki hastaların idrar, kan kültürü, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar kateteri ve akciğer plevral sıvısı, vajinal ve rektal sürüntüden izole edilen 85 Enterokoktan 63'ü *E. faecalis*, 22'si *E. faecium* olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 85 Enterokok izolatında antibiyotik direnç ve virulans genleri PZR yöntemi ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda 18 izolatın çoklu direnç genine sahip olduğu ve tüm izolatların %21'inin vankomisin direncinden sorumlu *vanA*, %27'sinin yüksek düzey gentamisin direncinden sorumlu *aac(6')-le-aph(2'')*-*la* geni, %40'ının eritromisin direncinden sorumlu *ermB* ve %48'inin tetrasiklin direncinden sorumlu *tetM* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, *asaI*, *cylA*, *ace/acm*, *hyl*, *esp* ve *gelE* genlerinin varlığı PZR yöntemi ile incelenmiş ve izolatlardaki virulans gen yüzdeleri %69, %14, %40, %21, %41 ve %55 olarak belirlenmiştir.

Hasani ve diğ. (2012) İran'da yaptıkları çalışmada, 220 klinik Enterokok izolatının Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre 133 (%60.45)'ünde yüksek düzey gentamisin direnci ve *aac(6')-le-aph(2'')* geni tespit edilmiştir. Yüksek düzey gentamisin dirençli izolatların %88'i penisiline, %42.9'u ampisiline, %95.5'i siprofloksasine, %67.96'sı streptomisine ve %32.33'ü vankomisine dirençli olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada 220 izolatın %19.54'ü β-hemolitik aktivite gösterirken, %65.9'unun *gelE*, %55'inin *cpd*, %53.6'sının *asaI*, %51.8'inin *ace* ve %49.5'inin *esp* genine sahip olduğu belirlenmiş ve çalışma sonucunda sahip olduğu virulans genlerinin çoklu antibiyotik direncinin meydana gelmesinden sorumlu olduğu vurgulanmıştır. Sharifi ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada, 48 VRE izolatından 5'ini *vanA* genotipinde, 3'ünü *vanB* genotipinde bulmuşlar ve VRE izolatlarında *asaI*, *esp*, *gelE*, *ace* ve *cpd* genlerinin varlığını multipleks PZR yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, 4 suшта *asaI*, *gele*, *ace* ve *cpd*, 4 suшта *asaI*, *gelE* ve *cpd*, 1 suшта *gelE*, *ace* ve *cpd* ile 1 suшта *gelE* ve *cpd* genlerini saptamışlardır. Pereira ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada, 79 Enterokok izolatında biyofilm oluşturma kapasitesi ve jelatinaz üretimini fenotipik olarak incelerken, *agg*, *ace* ve *gelE* genlerinin varlığını PZR yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmanın

sonucunda, izolatların %10.34'ünde *ace*, %26'sında *agg*, %17.24'ünde ise *gelE* genini tespit etmişler ve bu genlerin *E. faecium*'da *E. faecalis*'e göre daha yüksek oranda bulmuşlardır. Aynı zamanda, biyofilm oluşturma yeteneğini *E. faecalis*'te %90, *E. faecium*'da %24.1 olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Jahanspas ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada, 125 *E. faecalis* ve 35 *E. faecium* olmak üzere toplam 160 Enterokok izolatında antibiyotik direnç profillerini ve virulans genlerinin varlığını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, izolatların %76.25'i rifampisine, %73.12'si eritromisine dirençli iken, vankomisine direnç gösteren 30 örnekten 27'sinin *vanA* fenotipinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, izolatların %87.5'inde *gelE*, %85.6'sında *cpd* ve %73.8'inde *asal* geni tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda da deniz suyundan izole edilen 66 Enterokok suşunun çoklu antibiyotik direnç genleri ve çoklu virulans faktörleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda, 12 farklı antibiyotik direnç geninden bir (%2.17) *E. faecalis* ve bir (%100) *E. gallinarum* suşunun en az 4 (*rpoB1*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *tetM* / *rpoB1*, *rpoB2*, *ermB*, *tetM*) antibiyotik direnç genine, 1 (%2.17) *E. faecalis* suşunun ise en fazla 11 (*vanA*, *vanB*, *acc(6')-aph(2'')*, *aphA-3*, *rpoB1*, *rpoB2*, *bla(Z)*, *ermB*, *catpIP*, *tetM* ve *tetL*) antibiyotik direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, 12 farklı virulans geninden 2 (%3.03) *E. faecalis* suşunun 12 gen bölgesi (*ace*, *gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *efaAfs*, *efaAfm*, *cpd*, *ccf*, *cob*, *agg* ve *fsr*) ile en fazla, 1 (%1.51) *E. gallinarum* suşunun ise 3 gen bölgesi (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) ile en az virulans profili içerdiği saptanmıştır.

Bakterilerde plazmitlerde kodlanan pek çok antibiyotik direnç geni ve virulans determinantları tanımlanmıştır. Plazmitler bu özellikleri sayesinde, hem pek çok direnç genini farklı bakterilere aktarımında rol oynadığından gıdada starter kültür olarak kullanımında hem de çevresel ve nozokomiyal enfeksiyonların yayılmasında da halk sağlığı açısından önemlidir. Enterokok suşlarında bulunan plazmit içeriğini belirlemeye yönelik çalışmalarda, Rosvoll ve diğ. (2010) 88 izolatta 1-7, Coleri ve diğ. (2004) moleküler büyüklükleri 2.08-56.15 kb arasında değişen 1-11, Yüksel (2012) 88 izolatta moleküler büyüklükleri 35.8-2.4 kb arasında değişen 1-7 plazmit tanımlamışlardır. Çalışmamızda Enterokok suşlarının plazmit profilleri moleküler büyüklükleri bilinen marker kullanılarak belirlenmeye çalışılmış ve toplamda 26 farklı moleküler büyüklükte plazmitlere sahip olduğu ve bir suşun en fazla 3 plazmit içerdiği saptanmıştır. Aynı zamanda, plazmit büyüklüklerinin 340 ile 32600 bp arasında değiştiği tespit edilmiş ve 2 *E. faecalis* suşunun ise, 2120 bp moleküler büyüklük ile aynı plazmit profiline sahip olabileceği belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, antibiyotik

direnç genleri ve virulans genlerinin aktarımından sorumlu plazmitlerin, virulans faktörlerinin yüksek oranda çıkmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, vankomisine direnç gösteren suşların plazmite/plazmitlere sahip olması da bu düşünceyi destekler niteliktedir.

Çevresel izolatlarda antibiyotik direnç genleri ve virulans genlerinin tespit edilmesi, Enterokokların halk sağlığı problemlerine yol açabileceğini göstermektedir. Enterokok epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalarda genellikle klinik ve gıda örneklerinden izole edilen Enterokok cinsi bakteriler üzerine çok sayıda araştırma bulunurken, yüksek tuzluluk ve değişen sıcaklık değerleriyle Enterokokların üremesine elverişli ortam oluşturan ve deniz ve plajlarda halk sağlığı açısından risk teşkil eden deniz sularındaki Enterokokların virulans faktörleri üzerine çalışma sayısı çok az olduğundan çalışmamızdan elde edilen veriler önemlidir.

Deniz suları, turistik, balıkçılık, rekreasyonel sulama gibi pek çok alanda etkin olmakla birlikte oral yolla su yutulması, dermal ya da doğal vücut boşluklarından geçişi ile direkt ya da balıklar ve diğer deniz canlılarının tüketilmesi ile indirekt yollarla insanlara geçmekte ve insanlarda enfeksiyona sebep olmaktadır.

Özellikle fekal kirlilik sonucu deniz sularına bulaşan Enterokokların sahip olduğu virulans genlerinin pek çoğunun diğer Enterokok türleri arasında aktarımı çoklu antibiyotik direnç ve çoklu virulans profillerine sahip patojen Enterokokların sayısında artışa neden olmaktadır. Bu durum da, Enterokokların tedavisinde problemlere yol açmakta her geçen gün yeni kuşak antibiyotiklere ihtiyaç duyulmasına sebep olmaktadır. Çevresel izolatlar ve nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilen Enterokokların sahip olduğu antibiyotik direnci ve virulans genlerinin bilinmesi, tedavide etkin ve hızlı bir yol izlenmesi açısından yol göstereceğinden çalışmamızdan elde edilen verilerin Enterokok epidemiyolojisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda bakteriyosin özellikli Enterokoklar gıdalarda starter kültür olarak yaygın olarak kullanılmakta olup konu ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen bulgularda görüldüğü üzere çevresel izolatlarda çoklu antibiyotik direnç genleri ve virulans genlerine sahip çok sayıda Enterokok bulunmakta olup gıdalarda kullanımında dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, konu ile ilgili çalışmaların sayısı az olduğundan Enterokok bakterilerinin kullanım alanlarında dikkat edilmesi gereken noktalar ile çalışmamız, epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000, Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark, *Diagnostic microbiology infectious diseases*, 37 (2), 127-37.
- Abriouel, H., Omar, N.B., Molinos, A.C., Lopez, R.L., Jose Grande, M., Martinez-Viedma, P., Ortega, E., Canamero, M.M., Galvez, A. 2008, Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical 265 samples, *International journal of food microbiology* 123, 38–49.
- Akçimen, B., 2010, *Hastane infeksiyonlarından izole edilen vankomisin dirençli Enterokokların pulsed field jel elektroforez yöntemiyle genotip tayini*, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- Aktepe, O.C., Aşık, G., Çiftçi, İ.H., Çetinkaya, Z., 2011, Klinik örneklerden izole edilen Enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 41 (2), 86-90.
- Albakkour, K., 2013, *Klinik örneklerden izole edilen Enterokokların antibiyotik direnç özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Alkan, S., Kuloğlu, F., Akata, F., 2016, Enterokok bakteriyemilerinde risk faktörlerinin değerlendirilmesi, *Klinik dergisi*, 29 (2), 65-70.
- Anderson, A.W. and Elliker, P.R., 1953, The nutritional requirements of lactic Streptococci isolated from starter cultures, I. growth in a synthetic medium1, *Journal of dairy science*, 36 (2), 161-167.
- Aparna, M.S. and Yadav, S., 2008, Biofilms: microbes and diseases, *The Brazilian journal of infectious disease*, 12 (6), 526–530.
- Aral, M., İsmihan, N., Paköz, E., Aral, İ., Doğan, S., 2011, Antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from various clinical samples, *Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, Cilt 68, 68 (2), 85-92.
- Arıkan Akan Ö., 2009, *Enterokok türlerinin mikrobiyolojisi ve antimikrobiyal direnç*, Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar, In: Arman, D., Ünal, S. (eds.), 1. Baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 123-36.
- Arias, C.A and Murray, B.E., 2012, The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance, *Nature reviews microbiology*, 10 (4), 266-78.

- Baldassari, L., Creti, R., Arciola, C.R., Montanaro, L., Venditti, M., Di Rosa, R., 2004, Analysis of virulence factors in cases of enterococcal endocarditis, *Clinical microbiology and infection*, 10, 1006-1008.
- Banerjee, T., Anupurba, S., Prevalence of virulence factors and drug resistance in clinical isolates of enterococci: A study from North India, *The Journal of pathology*, 2015:692612.
- Barbara, E. and Murray, D.M., 1998, Diversity among multidrug resistant enterococci, *Emerging infectious disease*, 4, 37-47.
- Barbosa, J., Ferraira, V., Teixeira, P., 2009, Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products, *Food microbiology*, 26, 527-532.
- Başustaoğlu, A., 2004, *Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu*, Gram pozitif bakteri infeksiyonları, In: Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S. (eds.), Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 141-158.
- Baylan, O., Nazik, H., Bektore, B., Cital, B.E., Turan, D., Ongen, B., Özyurt, M., Acikel, C.H., Haznedaroğlu, T., 2011, The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary enterococcus isolates, *Mikrobiyoloji bülteni*, 45, 430-445.
- Benge, G.R., 1988, Bactericidal activity of human serum against strains of *Klebsiella* from different sources, *Journal of medical microbiology*, 27 (1), 11-15.
- Berdard, A.G., 1989, The Bacteriological quality of tidal bathing waters in Sydney, *Water science and technology*, 21 (2), 65- 69.
- Bigeç, L., 2015, Balıklardan izole edilen *Enterococcus* türlerinin bazı virulans, teknolojik özellikleri ve antibiyotik dirençliliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bilgehan, H., 2000, Klinik mikrobiyoloji, Onuncu baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 271-279.
- Billström, H., Lund, B., Sullivan, A. and Nord, C.E., 2008, Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International journal of antimicrobial agents*, 32, 374-7.
- Borgmann, S., Niklas, D. M., Klare, I., Zabel, L. T., Buchenau, P., Autenrieth, I. B. and Heeg, P., 2004, Two episodes of vancomycinresistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit, *International journal of hygiene and environmental health*, 207, 386–389.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G., Dunny, G.M., Murray, B.E., 2006, Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease, *Journal of bacteriology*, 188(8):2875-84.
- Bravo, J.M., de Vincente, A., 1992, Bacterial die-of from sewage discharged through submarine outfalls, *Water science and technology*, 25 (9), 9-16.

- Britton, L., Malinowski, D.P. and Fridovich, I., 1978, Superoxide dismutase and oxygen metabolism in *Streptococcus faecalis* and comparisons with other organisms, *Journal of bacteriology*, 134, 229–236.
- Campbell, R.C., 1974, *Statistics for biologists*, Cambridge University Press, Second Edition, 385.
- Carlucci, A.F. and Pramer, D., 1960, An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. II. Salinity pH and nutrients, *Applied microbiology*, 8, 247–250.
- Cartwright, C. P., Stock, F., Fahle, G. A. and Gill, V. J., 1995, Comparison of pigment production and motility tests with PCR for reliable identification of intrinsically vancomycin-resistant enterococci, *Journal of clinical microbiology*, 33, 1931–1933.
- Ceryan, N., Ülkar, G.B., Gürbüz, O.A., Apaydın, N., Oskovi, H., Mert, A., 2000, *Enterokoklarda glikopeptid direnci*, 29. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı, 8-13 Ekim 2000, Antalya, 12-5.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., 2000, Vancomycin-resistant enterococci, *Clinical microbiology reviews*, 13 (4), 686-707.
- Chow, J.W., Thal, L.A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B., Zervos, M.J., 1993, Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial agents of chemotherapy*, 37, 2474–7.
- Chung, J.W., Bensing, B.A., Dunny, G.M., 1995, Genetic analysis of a region of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in positive regulation of conjugative transfer functions, *Journal of bacteriology*, 177, 2107–2117.
- Clewell, D.B., 1993, *Bacterial Conjugation*, In: Clewell, D.B. (ed.), Plenum Press, New York.
- CLSI, 2016, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, *M100 Clinical and Laboratory Standards Institute*, USA, ISBN 1-56238-923-8.
- Coburn, P.S. and Gilmore, M.S., 2003, The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells, *Cellular microbiology*, 5 (10), 661–669.
- Coburn, P.S., Hancock, L.E., Booth, M.C., Gilmore, M.S., 1999, A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolysin, *Infection and immunity*, 67 (7), 3339–3347.
- Coburn, P.S., Pillar, C.M., Jett, B.D., Haas, W., Gilmore, M.S., 2004, *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin, *Science*, 306 (5705), 2270-2.
- Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akcelik, M., Tukul, C., 2004, Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species, *The Journal of applied microbiology*, 50 (4), 213-9.

- Coque, T.M., Willems, R., Canton, R., Del Campo, R. And Baquero, F., 2002, High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50, 1035-1038.
- Coque, T.M., Willems, R.J.L., Fortu'n, J., Top, J., Diz, S., Loza, E., Canto'n, R. and Baquero, F., 2005, Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University Hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance, *Antimicrobial agent and chemotherapy*, 49, 2693-2700.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection, *Science*, 284 (5814), 1318–1322.
- Cox, C.R., Coburn, P.S., Gilmore, M.S., 2005, Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells, *Current protein and peptide science*, 6 (8), 77-84.
- Cömert, F., Külah, C., Eroğlu, Ö., Aktaş, E., 2007, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen enterokok izolatlarının üç yıllık değerlendirmesi, *Flora dergisi*, 12, 98-102.
- Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., 2004, Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources, *Journal of medical microbiology*, 53, 13-20.
- Çetinel Aksoy, S., 2008, *Süt dişi kanallarından enterococcus faecalis izolasyonu, kültürel ve moleküler yöntemlerle tanılanması ve antibiyotik duyarlılık profillerinden saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çetinkaya, F. ve Elal Muş, T., 2010, Yararları ve riskleriyle gıda kaynaklı Enterokoklar, *Uludađ Üniversitesi Veteriner Fakültesi dergisi*, 1, 77-83.
- Çetinkaya, Y., 2000, Vankomisine dirençli enterokoklar: Epidemiyoloji ve kontrol, *Flora*, 4, 195-204.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., 2000, Vancomycin-resistant Enterococci, *Clinical microbiology reviews*, 13, 686-707.
- Çiçek, A., Kuzucu, Ç., Durmaz, R., 2006, Bir yıl içerisinde kan kültürlerinden infeksiyon etkeni olarak izole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları, *Ankem dergisi*, 20 (1), 13-7.
- Çiçekler Tok, N., 2006, *Enterokoklarda vankomisin direnci*, Uzmanlık Tezi, T.C Sağlık Bakanlığı Haydarpařa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği.
- Çiftçi, A. ve Aksoy, A., 2015, Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları, *Journal of veterinary science*, 1(2), 1-10.

- Çöleri, A. ve Çökmüş, C., 2008, Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları, *Türk hijyen ve deneysel biyoloji*, 65 (2), 87-9.
- Dahlén, G., Blomqvist, S., Almståhl, A. and Carlén, A., 2011, Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections, *Journal of oral microbiology*, 4, 1.
- Davis, C.P., Fader, R.C., Avots-Avotins, A.E. and Gratzfeld, S., 1982, Expression of hemagglutination is dependent on environmental factors and bacterial concentration of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Current microbiology*, 7, 161-164.
- Derbentli, Ş., 1998, Nozokomiyal enterokok enfeksiyonları, *Galenos*, 23, 14-17.
- Devriese, L., Baele, M., Butaye, P., 2006, The genus enterococcus: taxonomy, *Prokaryotes*, 4, 163-174.
- Di Bonaventura, G., Stepanović, S., Vukovic, D., Holá, V., 2007, Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci, *Apmis*, 115 (8), 891-9.
- Eaton, T.J. and Gasson, M.J., 2001, Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates, *Applied and environmental microbiology*, 67: 1628-35.
- Elder, J.K. and Southern, E.M., 1983, Measurement of DNA length by gel electrophoresis (II): comparison of methods for planting mobility of fragment length, *Analytical biochemistry*, 170, 38-44.
- Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E., Vasi, F., 1966, A new culture medium for medical bacteriology, *American journal of clinical pathology*, 45 (4), 502-4.
- Enne, V.I., Delsol, A.A., Roe, J.M., Bennet, P.M., 2004, Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 53 (2), 203-7.
- Esen, Ş., Sünbül, M., Barut, Ş., Eroğlu, C., Saniç, A., Leblebicioğlu, H., 2001, Glikopeptid, beta laktam ve aminoglikozit grubu antibiyotiklerin Enterokoklara invitro etkinliği, *Ankem dergisi*, 15 (1), 59-63.
- Etiz, P., Kibar, F., Ekenoğlu, Y., Yaman, A., 2014, İdrar kültüründen izole edilen Enterokok türlerinin antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 44 (3), 107-113.
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. and Huebner, J., 2006, Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides, *Infection and immunity*, 74, 4164-4171.
- Facklam, R.R. and Teixeria, L.M., 1998, *Enterococcus*, Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections, Vol 2 (Systematic Bacteriology), In: Collier, L., Bolows, A. (eds.), 9th edition, London, 82-669.

- Gold, H.S., Unal, S., Cercenado, E., Thauvin-Eliopoulos, C., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C.B., Moellering, R.C., 1993, A gene conferring resistance to vancomycin but not teicoplanin in isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* demonstrates homology with vanB, vanA, and vanC genes of enterococci, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37 (8), 1604-9.
- Gökahmetoğlu, S., Sümerkan, B., Eşel, D., Karagöz, S., 1999, Kan kültürlerinden izole edilen Enterokok suşlarının vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozit dirençlerinin araştırılması, *Ankem dergisi*, 13 (1), 57-62.
- Guiton, P.S., Hung, C.S., Kline, K.A., Roth, R., Kau, A.L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K.W., Caparon, M.G., Hultgren, S.J., 2009, Contribution of autolysin and Sortase a during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development, *Infection and immunity*, 77 (9), 3626-38.
- Gutmann, L., Al-Obeid, S., Billot-Klein, D., Guerrier, M.L. and Collatz, E., 1994, Synergy and resistance to synergy between -lactam antibiotics and glycopeptids against glycopeptide resistant strains of *Enterococcus faecium*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38 (4), 824-829.
- Gülay, Z., 2002, Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu, *Toraks dergisi*, 3 (1), 75-88.
- Gülhan, T., Aksakal, A., Ekün, İ.H., Savaşan, S., Boynukara, B., 2005, Virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from humans and pets, *Turkish journal of veterinary animal sciences*, 30, 477-482.
- Gültekin, M., 2004, *Enterokoklar, Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenez*, Gram pozitif bakteri infeksiyonları, In: Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S. (eds.), Ankara, 121-140.
- Gültekin, S., 2015, *İstanbul ili Anadolu Yakası doğal kaynak sularının kimyasal ve bakteriyolojik analizleri*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gültekin, Z., 2014, *Köpeklerden izole edilen Enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S., 2002, Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction, *Nature*, 415, 84-87.
- Hallgren, A., Claesson, C., Saeedi, B., Monstein, H.J., Hanberger, H., Nilsson, L.E., 2009, Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin, *International journal of medical microbiology*, 299, 323-332.
- Hammad, A.M., Shimamoto, T. and Shimamoto, T., 2014, Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish, *Food microbiology*, 38, 62-66.
- Hasani, A., Sharifi, Y., Ghotaslou, R., Naghili, B., Hasani, A., Aghazadeh, M., Milani, M., Bazmani, A., 2012, Molecular screening of virulence genes in high-level gentamicin-

- resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens in Northwest Iran, *Indian journal of medical microbiology*, 30 (2), 175-181.
- Hashem, Y.A., Yassin, A.S., Amin, M.A., 2015, Molecular characterization of *Enterococcus* spp. clinical isolates from Cairo, Egypt, *Indian journal of medical microbiology*, 33 (5), 80-86.
- Hawkey, P.H., McCormick, A., Simpson, A.R.A., 1986, Selective and differential medium for the primary isolation of members of the proteae, *Journal of clinical microbiology*, 23, 600-603.
- Hendrickx, A.P., Willems, R.J., Bonten, M.J. and van Schaik, W., 2009, LPxTG surface proteins of enterococci, *Trends in microbiology*, 17 (9), 423-30.
- Herrero, I.A., Fernandez-Garayzabal, J.F., Moreno, M.A., Dominguez, L., 2004, Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci, *Journal of clinical microbiology*, 42, 1384-1385.
- Hijazi, N., Elmanama, A.A., Al-Hindi, A., 2009, Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized individuals in Gaza City, *Journal of public health*, 17, 243-249.
- Huycke, M.M., Sahm, D.F., Gilmore, M.S., Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future, *Emerging infectious disease*, 4 (2), 239-49.
- Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M., Swings, J., 2004, Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolate from food, *Applied and environmental microbiology*, 7, 1555-1562.
- Inoğlu, Z.N. ve Tuncer, Y., 2013, Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese, *Journal of food safety*, 33 (3), 369-377.
- Iraz, M., Ceylan, A., Akkoyunlu, Y., 2012, Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, *Ankem dergisi*, 26 (4), 176-80.
- Işıkgöz Taşbakan, M., 2010, Vankomisine dirençli Enterokok olguları, *Ankem Dergisi*, 24 (2), 82-84.
- İpek, D., 2015, *Vankomisin dirençli Enterokok kolonizasyon ve enfeksiyonunda risk faktörleri*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- Jacob, F., Lwoff, A., Simonovitch, A. and Wollman, E.L., 1953, Définition de quelques terms relatifs á la lysogénie, *Annales de l'Institut Pasteur*, 84, 222-224.
- Jahansepas, A., Aghazedah, M., Ahangarzadeh Rezaee, M., Hasani, A., Sharifi, Y., Aghazadeh, Y., Mardaneh, J., 2018, Occurrence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in various clinical infections: Detection of their drug resistance and virulence determinants, *Microbial drug resistance*, 24 (1), ISSN: 1076-6294.

- Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Poulsen, R.L., West, H., 1999, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn 1546 -like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark, *Antimicrobial agents of chemotherapy*, 43(3), 724-5.
- Jett, B. D., Huycke, M.M. and Gilmore, M.S., 1994, Virulence of enterococci, *Clinical microbiology reviews*, 7, 462-478.
- Jimmy, D.H., Sundufu, A.J., Malanoski, A.P., Jacobsen, K.H., Ansumana, R., Leski, T.A., Bangura, U., Bockarie, A.S., Tejan, E., Lin, B. and Stenger, D.A., 2013, Water quality associated public health risk in Bo, Sierra Leone, *Environmental monitoring and assessment*, 185, 241-251.
- Joiner, K.A., Grossman, N., Schmetz, M. and Leive, L., 1986, C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*, *The Journal of immunology*, 136 (2), 710-715.
- Kaçmaz, B., Akça, G., Sultan, N., 2004, Enterokokların antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması, *İnfeksiyon dergisi*, 18 (3): 287-92.
- Kapoor, L., Randhawa, V.S., Deb, M., 2005, Antimicrobial resistance of enterococcal blood isolates at a pediatric care hospital in India, *Japanese journal of infectious disease*, 58(2), 101-3.
- Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Chow, J., Clewell, D. and Kumon, D., 2000, Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci, *Journal of clinical microbiology*, 38, 3092-3095.
- Kasaroğlu, K., 2013, *Enterococcus faecium* klinik izolatlarında çoklu ilaç dirençlilik mekanizmalarının genetik doğası, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kawalec, M., Gniadkowski, M., Zaleska, M., Ozorowski, T., Konopka, L., Hryniewicz, W., 2001, Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain, *Journal of clinical microbiology*, 39 (5), 1781-7.
- Kayaoglu, G. and Orstavik, D., 2004, Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease, *Critical reviews in oral biology & medicine*, 15, 308-320.
- Kılıç, S., 2015, İstatistikî ifadeyle..., *Journal of mood disorders*, 5 (2), 92-4.
- Kimiran Erdem, A., Arslan, E.O., Sanli Yurudu, N.O., Zeybek, Z., Dogruoz, N. and Cotuk, A., 2007, Isolation and identification of enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals, *Environmental monitoring and assessment*, 125 (1-3), 219-28.
- Klaenhammer, T.R., 1993, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) microbiology reviews*, 12, 39-86.

- Klare, I., 2003, Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International journal of food microbiology*, 88 (2-3), 269- 290.
- Klein, G., 2003, Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of Enterococci from food and gastro-intestinal tract, *International journal of food microbiology*, 88 (2-3), 123-131.
- Kobayashi, N., Alam, M., Nishimoto, Y., Urasawa, S., Uehara, N., Watanabe, N., 2001, Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*, *Epidemiology and infection*, 126 (2), 197-204.
- Komiyama, E.Y., Lepesqueur, L.S.S., Yassuda, C.G., Samaranayake, L.P., Parahitiyawa, N.B., Balducci, I., Koga-Ito, C.Y., 2016, *Enterococcus* species in the oral cavity: prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility, *PLoSOne*, 11(9), e0163001.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., Procop, G., Woods, G., 2005, *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Sixth edition, Philadelphia, 700-711.
- Kutluk, İ., 2018, *Vankomisin dirençli Enterokoklarda direnç genlerinin varlığının belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Landman, D., Quale, J.M., Oydna, E., Willey, B., Ditore, V., Zaman, M., Patel, K., Saurina, G. and Huang, W., 1996, Comparison of five selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant Enterococci, *Journal of clinical microbiology*, 34 (3), 751-752.
- Lanthier, M., Scott, A., Zhang, Y., Cloutier, M., Durie, D., Henderson, V.C., Wilkes, G., Lapen, D.R., Topp, E., 2010, Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada, *Journal of applied microbiology*, 110, 407-21.
- Lapage, S.P., Shelton, J.E. and Mitchell, T.G., 1970, *In Methods in Microbiology*, Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (ed.), Vol. 3A, Academic Press, London, 116.
- Leclercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J. and Courvalin, P., 1989, Transfrable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 33, 10-15.
- Lehman, D.,C., 2011, *Biochemical identification of gram negative bacteria*, Diagnostic Microbiology, In: Mahon, C.,R., Lehman, D.,C. and Manuselis, G. (eds), W.B. Saunders, China, 182-198.
- Li, X., 2005, Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. *International journal of antimicrobial agents*, 25, 453-463.
- Line, J., Svetoch, E., Eruslanov, B., Perelygin, V., Mitsevich, E., Mitsevich, I., *et al.*, 2008, Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52, 1094-1100.

- Lopez, M., Saenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martinez, S., Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, F., Torres, C., 2009, Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425, *International journal of food microbiology*, 133, 172-178.
- Lowe, A.M., Lambert, P.A., Smith, A.W., 1995, Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci, *Infection and immunity*, 63, 703-6.
- MacFaddin, J.F., 1985, Media for isolation cultivation-maintenance of medical bacteria, Vol I. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Mah, T.F. and O'Toole, G.A., 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in microbiology*, 9 (1), 34-9.
- Malik, R.K., Montecalvo, M.A., Reale, M.R., Li, K., Maw, M., Munoz, J.L., *et al*, 1999, Epidemiology and control of vancomycinresistant enterococci in a regional neonatal intensive care unit, *The pediatric infectious disease journal*, 18 (4), 352-6.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupre, I., Sechi, L.A., 2003, Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin, *International journal of food microbiology*, 88, 291-304.
- Marekova, M., Nes, I.F., Laukova. A., De Vuyst, L., Skaugen, M., 2003, Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13, *Journal of applied microbiology*, 94, 52-530.
- Marothi, Y.A., Agrihotri, H., Dubey, D., 2005, Enterococcal resistance –An overview, *Indian journal of medical microbiology*, 23, 214-219.
- Mato, R., deLancestre, H., Carraher, M., Roberts, R.B., Tomasz, A., Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York City Hospital, *Microbial drug resistance*, 2, 309-17.
- Matyar, F. ve Dincer, S., 2010, Doğu Akdeniz'den izole edilen *Enterococcus faecalis* bakterilerinin antibiyotik ve ağır metal dirençliliği, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 5 (2), 172-178.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. ve Berkley, R.W., 1972, *Methods for studying bacteriocins*, *Methods in microbiology*, Norisand, J.R., Ribbons, N.W., (eds.) vol 7A, 315-442.
- McFarland, J., 1907, Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines, *Journal of the American medical association*, 14, 1176-1178.
- McGregor, K.F., Young, H.K., 2000, Identification and characterization of *vanB2* glycopeptide resistance elements in enterococci isolated in Scotland, *Antimicrobial agents of chemotherapy*, 44, 2341-2348.

- Medeiros, A.W., Pereira, R.I., Oliveira, D.V., Martins, P.D., D'azevedo, P.A., Van Der Sand, S., *et al.*, 2014, Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil, *Brazilian journal of microbiology*, 45, 327–332.
- Medell, M., Hart, M., Batista, M.L., 2014, Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados, *Biomédica*, 34 (1), 50-7.
- Meriç, M., Rüzgar, M., Gündeş, S., Willke, A., 2004, Hastanede yatan hastalardan izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere direnç durumu, *Ankem dergisi*, 18, 141-4.
- 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 hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, 66 (3), 117-21.
- Messi, P., Guerrieri, E., Niederhausern, S., Sabia, C., Bondi, M., 2006, Vancomycine-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples, *International journal of food microbiology*, 107, 218-222.
- Mete, E., Kaleli, İ., Cevahir, N., Demir, M., Akkaya, Y., Kiriş Satılmış, Ö., 2017, Enterokok türlerinin virulans faktörlerinin araştırılması, *Mikrobiyoloji bülteni*, 51 (2), 101-114.
- Miller, W.R., Munita, J.M. and Arias, C.A., 2014, Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci, *Expert review of anti-infective therapy*, 12 (10), 1221–123.
- Mirovic, V., Citic, J., Tomanovic, B., Nonkovic, Z., 2000, Antimicrobial resistance of Enterococci from clinical specimens, *Clinical microbiology and infectious*, 6 (1), 171.
- Mohamed, J.A. and Huang, D.B., 2007, Biofilm formation by enterococci, *Journal of medical microbiology*, 56 (12), 1581-8.
- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F. and Murray, B.E., 2004, Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*, *Infection and immunity*, 72, 3658– 3663.
- Mohanty, S., Jose, S., Singhal, R., Sood, S., Dhawan, B., Das, B.K., *et al.*, 2005, Species prevalence and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated in a tertiary care hospital of north India, *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 36, 962-5.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto C., Lombardi, A. and Lodi, R., 2006, Technological and molecular characterization of Enterococci isolated from NorthWest Italian dairy products, *International dairy journal*, 16, 867-875.
- Morinigo, A.M., Cornax, R., Castro, D., Martinez-Manzaneres, E., Borrego, J.J., 1990, Viability of *Salmonella* spp. and indicator microorganisms in seawater using membran diffusion chambers, *Antonie van Leewenhoek*, 57, 109-117.

- Mueller, J.H., Hinton, J., 1941, A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*, *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 48, 330–333.
- Mundy, L.M., Sahm, D.F., Gilmore, M., 2000, Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance, *Clinical microbiology reviews*, 13, 513–522.
- Muñoz, R., Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J.M., Rivas, B., Felipe, F.L., GómezCordovés, C. and Mancheño, J.M., 2009, Food phenolics and lactic acid bacteria, *International journal of food microbiology*, 132, 79-90.
- Muş, T.E. ve Çetinkaya, F., 2017, Bursa’da içme ve kullanma sularında indikatör ve bazı patojen bakterilerin varlığının araştırılması, *Toprak su dergisi*, 6 (1), 1-6.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Sillanpaa, J., Garsin, D. A., Hook, M., Erlandsen, S. L. & Murray, B. E., 2006, Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*, *Journal of clinical investigation*, 116, 2799–2807.
- Nallapareddy, S.R., Weinstock, G.M. and Murray, B.E., 2003, Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acn, a new member of the MSCRAMM family, *Molecular microbiology*, 47 (6), 1733-47.
- Nash, P., and Krenz, M.M., 1991, *Culture media*, Manual Of clinical microbiology n : A. Balows, A., W.J. Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. (ed.), 5th ed., American society for microbiology, Washington, D.C., 1226-1288.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V. and Holo, H., 1996, Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113-128.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Holo, H., 2007, Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*, *The journal of bacteriology*, 189, 1189–1198.
- O’Toole, G.A. and Kolter, R., 1998, Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Molecular microbiology*, 30 (2), 295-304.
- Oancea, C., Klare, I., Witte, W. and Werner, G., 2004, Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54, 232-235.
- Olson, B.H., Clark, D.L., Milner, B.B. and Stewart, M.H., 1991, Total coliform detection in drinking water: comparison of membrane filtration with Colilert and Coliquik, *Applied and environmental microbiology*, 57 (5), 1535-1539.
- Oryaşın, E., 2008, *Çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilen Enterokokların disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının tespiti*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Ödemiş, İ., Köse, Ş., Ersan, G., Çelik, D. ve Akbulut, İ., 2018, Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi, *Türk hijyen ve deneysel biyoloji*, 75 (4), 345-352.
- Özseven, A.G., Sesli Çetin, E., Cicoğlu Arıdoğan, B., Çiftçi, E., Özseven, L., 2011, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, *Ankem dergisi*, 5(4), 256-262.
- Paganelli, F.L., Willems, R.J., Leavis, H.L., 2012, Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm?, *Trends microbiology*, 20 (1), 40-9.
- Peel, T., Cheng, A.C., Spelman, T., Huysmans, M., Spelman, D., 2011, Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia, *Clinical microbiology infectious*, 18, 388-394.
- Pereira, R.I., Naiara, P.J., Santestevan, A., d'Azevedo, P.A., de Souza Motta, A., and Frazzon, A.P.G., 2017, Virulence Profiles in *Enterococcus* spp. Isolated from Raw Buffalo's milk in South Brazil, *Research journal of microbiology*, 12 (4), 248-254.
- Petts, D., 1984, Colistin-oxolinic acid-blood agar: a new selective medium for streptococci, *Journal of clinical microbiology*, 19, 4-7.
- Pillai, S.K., Sakoulas, G., Gold, H.S., Wennersten, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., and Inouye, R.T., 2002, Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections, *Journal of clinical microbiology*, 40 (7), 2651-2652.
- Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J., Torres, C., 2005, Study of faecal colonization by vanA-containing *Enterococcus* strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 55 (2), 278-80.
- Prüss, A., 1998, A review of epidemiological studies from exposure to recreational water, *International journal of epidemiology*, 27, 1-9.
- Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2000, Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence, *Infection and immunity*, 68 (5), 2579-86.
- Rice, L.B., Goldstein, F.W., 1991, Evidence for clonal spread of a single strain of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* to six hospitals in five states, *Journal of infectious disease*, 163, 780.
- Rich, C., Favre-Bonte, S., Sapena, F., Joly, B. and Forestier, C., 1999, Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. *FEMS microbiology letters*, 173, 55-61.
- Robert, C., Moellering, J.R., 2005, *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species, principles and practice of infectious diseases, 6. Baskı, In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds.), Elsevier Churchill Livingstone, New York, 2411-21.
- Rodrigues, J., Poeta, P., Martins, A., Costa, D., 2002, The importance of pets as reservoirs of resistant *Enterococcus* strains, with special reference to vancomycin,

Journal of veterinary medicine series B, Infectious Diseases And Veterinary Public Health, 49, 278-280.

- Rosenow, E.C., 1919, Studies on elective localization, focal infection with special reference to oral sepsis, *Journal of dental research*, 1, 205-249.
- Rosvoll, T.C., Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, P.J., Sollid, J.E., Simonsen, G.S., Jensen, L.B., Nielsen, K.M., Sundsfjord, A., 2010, PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501- and pHTbeta-related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin-antitoxin systems, *FEMS immunology and medical microbiology*, 58 (2), 254-68.
- Sabia, C., Niederhausern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Anacarso, I., Manicardi, G., *et al.*, 2008, Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources, *Journal of applied microbiology*, 104, 970-979.
- Sánchez Valenzuela A., Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Pérez Pulido, R., Abriouel, H., 2013, Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods, *Foodborne pathogen and disease*, 10 (2), 143-9.
- Sarika, A.R., Lipton, A.P., Aishwarya, M.S., and Dhivya, R.S., 2011, Efficacy of bacteriocin of *Enterococcus faecalis* CD1 as a biopreservative for high value marine fish reef cod (*Epinephelus diacanthus*) under different storage conditions, *Journal of microbiology and biotechnology research*, 1 (4), 18-24.
- Sava, I.G., Heikens, E., Huebner, J., 2010, Pathogenesis and immunity in enterococcal infections, *Clinical microbiology and infection*, 16 (6), 533-540.
- Savaşan, S., Kaya, O., Kırkan, Ş., Çiftçi, A., 2008, Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55, 107-110.
- Sayiner, H.S., 2008, *Hastanemizde sürveyansla saptanan VRE'lerin dağılımı, antibiyotiklere duyarlılıkları ve kolonize hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.
- Schouten, M.A., Hoogkamp-Korstanje, J.A., Meis, J.F., Voss, A., 2000, Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe, *European journal of clinical microbiology infectious diseases*, 19, 816.
- Shahraki, S. and Mousavi, M.R.N., 2017, Determination of virulence factors in clinical multidrug resistance Enterococci isolates at Southeast of Iran, *Jundishaper journal of microbiology*, 10 (5), e45514.
- Shankar, N., Baghdayan, A.S., Gilmore, M.S., 2002, Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycinresistant *Enterococcus faecalis*, *Nature*, 417, 746-750.

- Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., Gilmore, M.S., 1999, Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein, *Infection and immunity*, 67, 193–200.
- Sharifi, Y., Hasani, A., Ghotaslou, R., Varshochi, M., Hasani, A., Aghazadeh, M., Milani, M., 2012, Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of northwest of Iran, *The open microbiology journal*, 6, 34–39.
- Shepard, B.D. and Gilmore, M.S., 2002, Antibiotic resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance, *Microbes and infection*, 4 (2), 215-24.
- Sillanpaa, J., Nallapareddy, S.R., Prakash, V.P., Qin, X., Hook, M., Weinstock, G.M. and Murray, B. E., 2008, Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*, *Microbiology*, 154, 3199–3211.
- Soheili, S., Ghafourian, S., Sekawi, Z., Neela, V., Sadeghifard, N., Ramli, R., Hamat, R.A., 2014, Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates, *The scientific world journal*, 6, 623174.
- Sood, S., Malhotra, M., Das, B.K. and Kapil, A., 2008, Enterococcal infections and antimicrobial resistance, *Indian journal of medical research*, 128, 111-21.
- Stepanovic, S., Vucovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M.A., 2000, Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of microbiological methods*, 40, 175–179.
- Stiles, M.E., Holzaphel, W.H., 1997, Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International journal of food microbiology*, 36, 1-29.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002, Biofilms as complex differentiated communities, *Annual review of microbiology*, 56, 187-209.
- Stovcik, V., Pristas, P., Javorsky, P., 2008, Antibiotic resistance patterns and resistance genes in enterococci isolated from sheep gastrointestinal tract in Slovakia, *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*, 52 (1), 53-57.
- Sun, H., Wang, H., Xu, Y., Jones, R.N., Costello, A.J., Liu, Y., Li, G., Chen, M., Mendes, R.E., 2012, Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 74 (4), 399-403.
- Suppola, J.P., Kolho, E., Salmenlinna, S., Tarkka, E., Vuopio-Varkila, J. and Vaara, M., 1999, *vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality, *Journal of clinical microbiology*, 37(12): 3934–3939.
- Şamlıoğlu, P., Ece, G., Atalay, S., Köse, Ş., 2011, Yoğun bakım birimlerinden izole edilen Gram pozitif koklarda daptomisin duyarlılığı, *Ankem dergisi*, 25 (3), 173-7.

- Şekercioğlu, A.O., Vural, T. Çolak, D., Ögünç, D., Öngüt, G., 1998, Kan kültürlerinden izole edilen Enterokok türlerinin antibiyotik duyarlılık ve yüksek düzey gentamisin dirençliliklerinin saptanması, *Ankem dergisi*, 12, 2114.
- Şentürk, E., 2017, *Antimikrobiyel aktiviteye sahip Enterokok suşlarının moleküler düzeyde tanımlanması ve antibiyotik dirençlilik düzeylerinin saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976, Bacteriosins of Gram-positive bacteria, *Bacteriology reviews*, 40, 722-756.
- Teixeira, L.M., Carvalho, M.G.S., Facklam, R.R., 2009, *Klinik mikrobiyoloji*, Atlas Kitapçılık, Ankara, 1, 430-438.
- Teixeira, L.M., Carvalho, M.G.S., Shewmaker, P.L., Facklam, R.R., 2011, *Enterococcus*, Manual of clinical microbiology, In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Tenover, M.C., Tenover, M.C. (eds.), 10th ed., Washington, D.C., ASM Press, 350-64.
- Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S., Shankar, N., 2003, Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century, *Cellular molecular life sciences*, 60, 2622–2636.
- Todd, E.W. and Hewitt, L.F., 1932, A new culture medium for the production of antigenic streptococcal hemolysin, 35 (6), 973-974.
- Togay, S.Ö., Keskin, A.Ç., Açık, L., Temiz, A., 2010, Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods, *Journal of applied microbiology*, 109, 1084–1092.
- Toledo-Aran, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., Lasa, I., 2001, The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation, *Applied and environmental microbiology*, 67 (10), 4538-45.
- Toprak Ülger, İlki, A., ÖZEL, N., Balkan, N., Söyletir, G., 2011, Meropenem e-test, *Bacteroides fragilis* suşlarında karbapenem direnç geni cfiA varlığını tahmin etmede kullanılabilir mi?, *Mikrobiyoloji bülteni*, 45 (3), 385-391.
- Torlak, Ö.F., 2013, *Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen Enterococcus'ların virülans faktörleri ve antibiyotik dirençlilikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Toutouza, M., Skandami, V., Poujiouko-Ber, M., Fakiri, H., Karabassi, V., Komninou, Z., 2001, Resistance phenotypes in Enterococci isolated from clinical specimens during 3 year period, *Clinical microbiology and infectious*, 6 (1), 1-394.
- Tunail, N., 1999, *Microflora of the intestine/biology of the Enterococcus spp.*, In: Encyclopedia of food microbiology, Robinson R.K. (chief ed), Academic Press, UK, 1365-1373.
- Tünger, Ö., 2012, Vankomisine dirençli Enterokok infeksiyonlarının tedavisinde eski ve yeni tedavi seçenekleri, *Ankem dergisi*, 26 (4), 215-227.

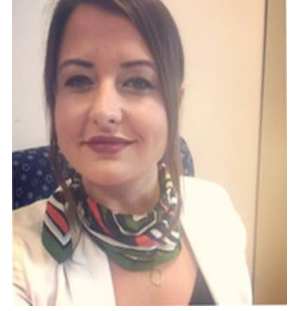
- Tyne D.V., Martin M.J. and Gilmore, M.S. , Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin, *Toxins*, 5, 895-911.
- Upadhyaya, P.M.G., Ravikumar, K.L., Umaphy, B.L., 2009, Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian journal of medical microbiology*, 27, 301-5.
- Uttley, A.H.C., Collins, C.H., Naidoo, J., George, R.C., 1988, Vancomycin resistant enterococci (letter), *Lancet*, 1(8575-6), 57-8.
- Valenzuela, A.S., Ben Omar, N., Abriouel, H., López, R.L., Veljovic, K., Cañamero, M.M., Topisirovic, M.K.L. and Galvez, A., 2009, Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in Enterococci from artisan foods of animal origin, *Food control*, 20 (4), 381-385.
- van Belkum, M.J., Stiles, M.E., 2000, Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria, *Natural product reports*, 17 (4), 323-35.
- van den Braak, N., van Belkum, A., Kreft, D., te Witt, R., Verbrugh, H.A., Endtz, H., 1999, The prevalence and clonal expansion of high-level gentamicin-resistant enterococci isolated from blood cultures in a Dutch university hospital, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 44 (6), 795-798.
- Vergidis, P.I. and Falagas, M.E., 2008, New antibiotic agents for bloodstream infections, *International journal of antimicrobial agents*, 32, 60-5.
- Vural, T., Şekercioğlu, A.O., Ögünç, D. ve diğ., 1999, Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu, *Ankem dergisi*, 13 (1), 1-4.
- Waar, K., 2004, *Pathogenesis of nosocomial infections with Enterococcus faecalis*, Nederlandse Samenvatting, University of Groningen.
- Wardal, E., Markowska, K., Żabicka, D., Wróblewska, M., Giemza, M., Mik, E., Hanna Połowniak-Pracka, H., Woźniak, A., Hryniewicz, W. and Sadowy, E., 2014, Molecular analysis of VanA outbreak of *Enterococcus faecium* in two Warsaw Hospitals: The importance of mobile genetic elements, *BioMed research international*, Article ID: 575367, 12.
- Wax, R.G., Lewis, K., Salyers, A., Taber, H., 2008, Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus faecium* 228, *Antimicrobial agents chemotherapy*, 34, 358-36.
- Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, F., 1999, Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe, *Emerging infectious diseases*, 5 (3), 329-35.
- Williams, J.J. and Hergenrother, P.J., 2008, Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria, *Current opinion in chemical biology*, 12, 389– 399.
- Winn, W., Stephan, A., Janda, W., Koneman, E.W., Procop, G., 2006, *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, In: Wilkins, W.L., 6.baskı, 40- 643.

- Woodford, N., Chadwick, P.R., Morrison, D. and Cookson, B.D., 1997, Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their genotypes during an outbreak, *Journal of clinical microbiology*, 36, 2966-2968.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2008, Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131, *Meat science*, 80 (2), 194-203.
- Xu, Y., Singh, K.V., Qin, X., Murray, B.E., Weinstock, G.M., 2000, Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis, *Infection and immunity*, 68, 815-823.
- Yamazhan, T., ve Ulusoy, S., 2013, *Vankomisine dirençli enterokoklar*, Hastane infeksiyonları, Doğanay, M., Ünal, S., Çetinkaya Şardan, Y. (ed.), Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 355-7.
- Yıldırım, M., 2007, Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar, *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 46-52.
- Yuce, A., Karaman, M., Gulay, Z., Yulug, N., 2001, Vancomycin-resistant enterococci in neonates, *Scandinavian journal of infectious diseases*, 33 (11), 803-5.
- Yüce, A., Karaman, M., Gülay, Z., Yuluğ, N., 1999a, Yenidoğanlarda vankomisin dirençli enterokokların fekal taşıyıcılığı, *Ankem dergisi*, 13, 7-11.
- Yüce, A., Özkütük, A., Gülay, Z., Yuluğ, N., 1999b, Enterokoklarda aminoglikozit vankomisin direncinin araştırılması, *Ankem dergisi*, 13 (2), 105.
- Yüksel, F., 2012, *Gıda Kaynaklı Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium suşlarında virülans faktörlerin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T., 2008, Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance, *FEMS microbiology reviews*, 32 (2), 361-85.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı İpek ADA
 Doğum Yeri BAKIRKÖY
 Doğum Tarihi 25.06.1988
 Uyruğu T.C. Diğer:
 Telefon 05357392226
 E-Posta Adresi adaipekk@gmail.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Biyoloji
 Mezuniyet Yılı 07.06.2010

Yüksek Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Biyoloji
 Programı Temel ve Endüstriyel Programı

Doktora

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Biyoloji Anabilim Dalı
 Programı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

Makale ve Bildiriler

- 1- Ada, İ. ve Candemir, F. (2019). Determination of Antibacterial Effect of *Punica granatum* Shell Extract, *Aurum journal of health sciences*. 1 (2):79-86.
- 2- Ada, İ. ve Kimiran, A. (2018). Determination of Recovery Rates of *Legionella* Bacteria by Different Methods, *International journal of environmental research and technology*. 1(3):01-07.
- 3- Ada, İ., “*Punica granatum* Kabuğu Ekstraktının Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması”, 3. Uluslararası Sosyal Beşeri ve Eğitim Bilimleri Kongresi, Zeytinburnu, İstanbul, TÜRKİYE, 17-18 Aralık 2018, ss.985.
- 4- Ada, İ. ve Kimiran, A., “Determination of Recovery Rates of *Legionella*

Bacteria at Different Concentrations by Conventional Culture, FISH and PCR Methods”, 3. Uluslararası Sosyal Beşeri ve Eğitim Bilimleri Kongresi, Zeytinburnu, İstanbul, TÜRKİYE, 17-18 Aralık 2018, ss.1008.

- 5- Ada, İ., “Zihinsel Engelli Bireylerde Kendine Zarar Verme Davranışını Azaltmaya Yönelik Farklı Yaklaşımlar”, İstanbul Üniversitesi Engellilik Araştırmaları Dünden Bugüne Engellilik Konferansı, Fatih, İstanbul, TÜRKİYE, 16 Kasım 2018, p.25.
- 6- Arslan Aydoğdu E.Ö., Ada İ., Erdem A., "Investigation of antibiotic resistance genes in *Salmonella* isolates", 10th Congress Microbiologia Balkanica, Sofya, BULGARISTAN, 16-18 Kasım 2017, pp.1-1.
- 7- Ada İ., Erdem A., "Identifications Of Proper Methods To Determine *Legionella pneumophila* Bacteria Exposed To Different Environmental Conditions", 6th Congress of European Microbiologists, Maastricht, HOLLANDA, 7-11 Haziran 2015, pp.1-1.
- 8- Ada İ., Kimiran Erdem A., “*Legionella pneumophila* Bakterilerinin Geri Kazanımında Uygun Yöntemlerin Tespiti”, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, TÜRKİYE, 23-27 Haziran 2014.