



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ENTEROKOK İZOLATLARINDA *esp*, *cylB* ve *gelE* VİRULANS  
FAKTÖRÜ GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Hazırlayan  
Bio. Narçın MURİQİ

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ÇANAKKALE-2016

## **BEYAN FORMU**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiç bir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütun bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütun bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8' de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

**Tarih:** 29.09.2016

**Tez Sahibi Adı ve Soyadı:** Narçın MURİQİ

**İmza:** N.Muriqi

## ÖZET

Enterokoklar hastane kökenli enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen bakteriler olup oluşturdukları enfeksiyonlara karşı tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklere geliştirdikleri direnç sayesinde hastanelerin önemli sorunları arasında yer almaktadır. Enterokokların en önemli virulans faktörleri arasında hemolizin veya sitolizin (*cyl*), jelatinaz (*gelE*), enterokokal yüzey proteini (*esp*), agregasyon faktörü, MSCRAMM Ace, kapsül hücre duvarı polisakkaritleri, lipoteikoik asit, süperoksitler, seks feromonları, hyaluronidaz, Efa-A, AS-48 ve antibiyotik direnci bulunmaktadır.

Bu çalışmada enterokok izolatlarında önemli virulans faktörü genlerin mevcudiyetinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik ve sürveyans örneklerinin rutin incelenmesi sonucunda enterokok olduğu belirlenen 200 izolat kullanıldı. Bu suşlar 91 (biri vankomisin dirençli) *E.faecalis*, 102 (66'sı vankomisin dirençli) *E faecium*, 5 *E.gallinarum* ve 2 *E.avium*'dan oluşmaktaydı. Bu etkenlerden DNA izolasyonu ve *esp*, *gelE* ve *cylB* genlerini spesifik primerler kullanarak amplifiye eden PCR analizi gerçekleştirildi. Çalışma sonuçlarına göre *esp*, *gelE* ve *cylB* genleri sırasıyla toplam 167(% 84), 52 (%25,5) ve 33 (%16,5) izolatta belirlendi. Her üç geni (*esp*, *gelE*, *cylB*) ihtiva eden izolat sayısı 11 (%5,5) olarak bulundu.

Çalışma sonuçları araştırma kapsamındaki enterokokların klinik veya surveyans örneklerinden izole edilme veya vankomisine dirençlilik durumları ayırt edilmeksizin büyük bir bölümünün önemli virulans potansiyeline sahip olduklarının göstermektedir. Bu durum, enterokoklarda başta *esp*, *gelE* ve *cylB* olmak üzere diğer virulans belirleyicilerinin de dikkatle izlenmesinin uygun kontrol ve mücadele yöntemleri için gerekli olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Enterokok, virulans, *esp*, *gelE*, *cylB*

## ABSTRACT

### Determination of *esp*, *cylB* and *gelE* virulence factor genes of *Enterococcus* isolates

*Enterococci*, commonly isolates agent from hospital-acquired infections, have growing consideration due to their increasing properties of antimicrobial resistance. The important virulence factors of *Enterococcus* are hemolysis or cytolysin (*cyl*), gelatinase (*gel*), enterococcal surface protein (*esp*), aggregation factor, MSCRAMM ACE, capsule cell wall polysaccharides, lipoteichoic acid, superoxides, sex pheromones, hyaluronidase, Ef-A, AS-48 and antibiotic resistance.

The present study aimed to analyze existence of virulence factor genes of *Enterococcus* spp. isolates. For this purpose, 200 *Enterococcus* strains isolated from surveillance and clinical samples in the Microbiology Laboratory of Çanakkale Onsekiz Mart University Hospital were used. These isolates consisted of 91 (one of them is vancomycin resistant) *E.faecalis*, 102 (66 of them are vancomycin resistant) *E faecium*, 5 *E.gallinarum* and 2 *E.avium*. DNA isolation and PCR using specific primers were performed from these bacteria. The *esp*, *gelE* and *cylB* genes were determined in 167 (84%), 52 (25.5%) and 33 (16.5%) isolates, respectively. The 11 (5.5%) strains were found as containing all three virulence genes (*esp*, *gelE*, *cylB*).

These results show that majority of enterococcus isolates potentially have important virulence factors unbound from isolation material as surveillance and clinical samples and the status of antimicrobial resistance. This suggests that the monitoring of virulence factors especially *esp*, *gelE* and *cylB* may be necessary for appropriate control and preventive measures of enterococcal diseases.

**Key Words:** *Enterococci*, virulence, *esp*, *gelE*, *cylB*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle bana yön gösteren, tez çalışmam boyunca karşılaştığım zorluklarda sorularımı sabırla yanıtlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet ÜNVER'e,

Bölümümüzde bulunan ve eğitimimde büyük katkıları olan değerli hocalarım başta Prof. Dr. Müşerref TATMAN OTKUN olmak üzere, Doç. Dr. Alper AKÇALI, Yard. Doç. Dr. Satı Zeynep TEKİN ve Yard. Doç. Ahmet VURAL'a sonsuz teşekkürler.

PCR'da pozitif kontrol olarak kullandığım Enterokok suşlarını gönderen Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Merkez Laboratuvarı'ndan Dr. F. Filiz Arı'ya destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana her konuda yardımcı olan Uzm. Bio. Ümit KARADELİ ve sevgili eşi aynı zamanda canım arkadaşım Uzm. Bio. Nimet KARADELİ, ve Bio. Mümin SARGIN'a, destekleriyle beni güçlendiren ve yanımda olan canım kuzenlerim Neslihan MURİQİ ve Xhennet MURİQİ'ye, değerli arkadaşlarım Mol. Bio. Adelina ELEZAJ, Uzm. Bio. Sinem KULAKSIZ, Dyt. Zeynep SİVASLI ve Hakan KARAMUÇO'ya çok teşekkür ederim.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi personellerine beni her seferinde hoşgörüle karşıladıkları için teşekkürler.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi hayatımda sahip olduğum en değerli varlığım, kişiliğini, sabrını örnek aldığım canım annem Blerina MURİQİ ve maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, yüksek lisansımı tamamlamamdaki en büyük destekçim canım kardeşim Vedat MURİQİ'ye sonsuz teşekkürler.

Hayatta olmasa da her zaman yanımda hissettiğim dimdik durmama sebep gökyüzündeki kahramanım canım babam Orhan MURİQİ'ye ithafen.

ÇANAKKALE, EYLÜL 2016

## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| TEZ ONAY FORMU                                   | i    |
| THESIS APPROVAL FORM                             | ii   |
| BEYAN FORMU                                      | iii  |
| ÖZET   | iv   |
| ABSTRACT   | v    |
| TEŞEKKÜR   | vi   |
| İÇİNDEKİLER                                      | vii  |
| TABLO LİSTESİ                                    | x    |
| ŞEKİL LİSTESİ                                    | xi   |
| RESİM LİSTESİ                                    | xii  |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ                  | xiii |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ                                 | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER                                | 3    |
| 2.1. Epidemiyolojisi ve Tarihçesi                | 3    |
| 2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri                  | 8    |
| 2.2.1. Hücre Duvarı ve Antijenik Yapısı          | 9    |
| 2.2.2. Üreme ve Fizyolojisi                      | 9    |
| 2.2.3. Boyanma ve Görünümü                       | 11   |
| 2.2.4. Genom Özelliği ve Genetik Bilgi Transferi | 12   |
| 2.3. İdentifikasyon                              | 14   |
| 2.3.1. Cins Düzeyinde Sınıflandırma              | 15   |
| 2.3.2. Tür Düzeyinde Sınıflandırma               | 18   |
| 2.3.3. Moleküler Testler                         | 19   |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.3.1. REA Bazlı Teknikler                         | 20 |
| 2.3.3.2. Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı Teknikler | 21 |
| 2.3.3.3. Dizi Analizi Teknikleri                     | 23 |
| 2.4. Patojenite ve Virulans Faktörleri               | 23 |
| 2.4.1. Enterokokal Yüzey Proteini                    | 24 |
| 2.4.2. Hemolizin/Sitolizin                           | 25 |
| 2.4.3. Jelatinaz                                     | 26 |
| 2.4.4. Diğer Virulans Faktörleri                     | 27 |
| 2.5. Korunma ve Kontrol                              | 31 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER                                | 34 |
| 3.1. Gereçler  | 34 |
| 3.1.1. Araştırmanın türü                             | 34 |
| 3.1.2. Bakteri İzolatları                            | 34 |
| 3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar         | 35 |
| 3.1.4. Kullanılan Gereçler                           | 36 |
| 3.2. Yöntem  | 37 |
| 3.2.1. DNA İzolasyonu                                | 38 |
| 3.2.2. PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması        | 39 |
| 3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez                       | 40 |
| 3.2.4. Jelin Görüntülenmesi                          | 40 |
| 4. BULGULAR  | 41 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ                                 | 47 |
| 6. KAYNAKLAR   | 52 |
| 7. EKLER   | 58 |

|  |    |
|--|----|
| Ek 1. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü |    |
| Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi                                     | 58 |
| Ek 2. Etik Kurul Onay Formu  | 59 |
| Ek 3. Özgeçmiş   | 60 |





## TABLO LİSTESİ

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| <b>Tablo 1.</b> Enterokokların Sınıflandırılması  | 5            |
| <b>Tablo 2.</b> Enterokok Türlerinin Gruplara Göre Ayrımı   | 6            |
| <b>Tablo 3.</b> <i>E.faecalis</i> Suşlarında Bazı Tip Transpozonların Kodladığı Bölgeler                        | 14           |
| <b>Tablo 4.</b> Çalışmada Kullanılan Toplam Bakteri İzolatları  | 34           |
| <b>Tablo 5.</b> Çalışmada Kullanılan Primerlerin Dizilimleri  | 36           |
| <b>Tablo 6.</b> <i>Esp</i> , <i>gelE</i> ve <i>cylB</i> Genlerinin Pozitiflik Oranı ve İzolatlara Göre Dağılımı | 43           |
| <b>Tablo 7.</b> Çalışılan İzolatların Materyallere Göre Dağılımı  | 45           |
| <b>Tablo 8.</b> Pozitif Bulunan Virulans Genlerinin Materyallere Göre Dağılımı                                  | 46           |

## ŞEKİL LİSTESİ

|  | <b>Sayfa</b> |
|--|--------------|
| <b>Şekil 1.</b> <i>E.faecalis</i> Hücre Duvarındaki Polimerlerin Şekli | 9            |
| <b>Şekil 2.</b> Entrokokların Gram Boyama Sonucu Mikroskopta Görüntüsü | 11           |
| <b>Şekil 3.</b> Enterokok Tanımlanmasında İzlenmesi Gereken Aşamalar   | 16           |



## RESİM LİSTESİ

|   | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| <b>Resim 1.</b> <i>esp</i> geni PCR amplifikasyonu (933 bç) elektroforez görüntüsü  | 41           |
| <b>Resim 2.</b> <i>gelE</i> geni PCR amplifikasyonu (419 bç) elektroforez görüntüsü | 42           |
| <b>Resim 3.</b> <i>cybB</i> geni PCR amplifikasyonu (843 bç) elektroforez görüntüsü | 42           |



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AF: Agregasyon Faktörü

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

APACHE: Acute Physiological and Chronic Health Evaluation

bç: Baz Çifti

BEA: Bile-Esculin Agar

BHI: Brain Heart Infussion

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

cm: Santimetre

CDC: Centers for Disease Control

CNA: Columbia-Colistin-Nalidixic Acid Agar

Cyl: Sitolizin (Cytolysin)

dk: Dakika

EtBr: Etidyum Bromid

EARSS: European Antimicrobial Surveillance Systems

EfaA: *Enterococcus faecalis* antijen A

Esp: Enterokokal yüzey proteini (Enterokokal surface protein)

ETA: Endotrakeal Aspirat

EUCAST: European Centre for Disease Prevention and Control

g: Gram

Gel: Jelatinaz (Gelatinase)

GIS: Gastointestinal Sistem

HICPAC: (Hospital Infection Control Practice Advisory Committee

Hyl: Hyaluronidaz

ITS-PCR: Intergenic rRNA Spacer PCR

IV Kateter: İntravenöz Kateter

LAP: Leucine-  $\beta$ -naphthylamide

LAPase: Leucine Aminopeptidase

LTA: Lipoteikoik Asit

ml: Mililitre

MLTS: Multi Locus Sequence Typing

MSCRMM Ace: Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecule Adhesin of Collagen from *Enterococci*

NNIS: The National Nosocomial Infection Surveillance System

ORF: Açık Okuma Penceresi (Open Reading Frame)

PI: Patojenite Adası (Pathogenicity Island)

PCR: Zincirleme Polimeraz Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PEA: Phenylethyl Alcohol Agar

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

PMNL: Polimorfonükleer Lökosit

PYR: Pyrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide

PYRase: Pyrolidonyl Arilamidase

RAPD-PCR: Random Amplification of Polymorphic DNA PCR

rcf: Rölatif Santrifüj Kuvveti (Relative centrifugal force)

RCR: Rolling Circle Replicating Plasmid

RE: Restriksiyon Endonükleaz

REA: Restriksiyon Enzim Analizi

Rep-PCR: Repetitif PCR

sn: Saniye

SARA-PCR: Specific and Random Amplified PCR

TIGR: The Institute of Genomic Research

TNF: Tümör Nekroz Faktör

VR: Vankomisin Dirençli (Vankomisin resistant)

VRE: Vancomycin Resistant Enterococci (Vankomisin Dirençli Enterokok)

YBÜ: Yoğun Bakım nitesi





## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eski çağlardan beri enfeksiyonlar insanların çeşitli tedavi seçenekleriyle baş etmeye çalıştığı problemlerden biridir. O zamanların ciddi sorunu olan sıtma, amebiyaz gibi hastalıkların tedavisinde sırasıyla kinin ve emetin gibi bazı boyalar ve kimyasallar kullanılmıştır. 1929 yılında ilk defa İskoç bakteriyolog Alexander Fleming tarafından gözlemlenen penisilin, 1940 yılında da Chain ve Flarey tarafından *Penicillium notatum*'un salgılarından elde edilmiş ve birçok öldürücü hastalığa sebep olan mikroplara karşı kullanılmıştır. Penisilin mikropalara karşı olan öldürücü etkisinin keşfedilmesi o zamanlarda sağlık alanında yeni bir çağın oluşmasına sebep olmuştur. Ancak keşfedilen ilaçların uzun süreli ve düzensiz kullanımları günümüzde tıp alanında hâlâ savaşmak zorunda kalınan, ciddi enfeksiyonlar oluşturan mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı direnç kazanarak gelişmesini tetiklemiştir (Berzeg 2005).

Enterokoklar eski zamanlarda çok fazla virulan kabul edilmemiştir ancak günümüzde enterokokların cansız ortamlarda uzun süre canlı kalabilmeleri ve çoklu antibiyotik direnci gösterebilme gibi özelliklerinden dolayı özellikle hastanelerde olmak üzere ciddi problemler oluşturan mikroorganizmalar kategorisinde yerlerini almalarına sebep olmuştur. Enterokokların problemleri bakteriler olarak bilinmesinde antibiyotik direnci dışında virulans faktörlerinin de katkıları gözardı edilmemektedir. Biyofilm oluşturarak mikroorganizmanın bulunduğu ortamdan kaldırılmasını zorlaştırma, bireyde kemik yıkımına sebep olma gibi özelliklere sahip olan virulans faktörleri de göz önünde bulundurulduğunda virulans faktörlerinin enterokokların patojenitesini arttırmakla kalmayıp ciddi enfeksiyonların oluşumunda başrol oynadıkları apaçık ortadadır. İki-üç virulans faktörünü aynı anda içeren enterokok bakterisinin patojenitesinin daha fazla olduğu bilinmekle birlikte bakterinin tek bir virulans faktörünü bile içermesinin tehlikesi yapılan çalışmalarla her geçen gün kanıtlanmaktadır (Keskin 2014).

Enterokokal enfeksiyonların, eskiden hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen kökenli enfeksiyonlar olduğuna dair düşünceler vardı. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarla enterokokların sadece endojen kökenli değil eksojen kökenli



olarak da kişiler arasında yayılabileceği gösterilmiştir. Bu tanım özellikle dirençli enterokok türlerini kapsamakla birlikte onlar hastadan hastaya, veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaşabilmekte, ve hastane içi veya hastaneler arasında yayılarak enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler. Özellikle Vankomisin dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonu ve kolonizasyonu hastane enfeksiyonu açısından önemli bir sorunu teşkil etmektedir. Yoğun bakım ünitesi (YBÜ) gibi uzun süreli yatışların olduğu, antibiyotik kullanımının ve invazif girişimlerin fazla olduğu yerlerde VRE kolonizasyonu riski daha fazladır. En önemli VRE rezervuarı gastrointestinal sistem (GİS)'inde VRE taşıyan hastalardır. Bu hastalarda asemptomatik taşıyıcılık olabileceği için sürveyans kültürlerinin yapılması önerilir, aksi takdirde taşıyıcılık gözden kaçmaktadır (Karagöz 2005, Berzeg 2005).

Bu tez çalışmasında enterokoklara bu denli ciddi enfeksiyonlar yapma potansiyelini oluşturan virulans genlerinden epidemiyolojik olarak mevcut verilerle karşılaştırılabilecek özellikte olmaları nedenleriyle enterokokal yüzey proteini, jelatinaz ve sitolizin virulans faktörlerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla bunları kodlayan genler olan *esp*, *gelE* ve *cylB* genlerinin özgül bölgeleri amplifiye edilerek etkenlerin bu genlere sahip olup olmadıkları belirlenmiştir.

Klinik örneklerden ve rutin sürveyans çalışmalarından izole edilen etkenlerin sahip olduğu virulans genlerinin belirlenmesi, o genin bakteriye kazandırması muhtemel hastalık yapma gücü ve şiddeti hakkında bilgi sahibi olunmasına ve böylece antibiyotiklere direnç sorunu olan enterokoklar için yapılabilecek mücadele yöntemlerine katkı sağlayabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçesi, sınıflandırması ve epidemiyolojisi

Enterokoklar ilk zamanlarda streptokoklar grubu altında “fekal orjinli streptokoklar” olarak adlandırılmıştır. İlk enterokokal enfeksiyon 1899 yılında Fransa’da Thiercellin tarafından yayımlanan bir makalede bildirilmiştir. Makalede enterokoklar için “çiftli halde görülen bakteriler veya insan gaitasında kısa zincirler” tanımlaması yapılmıştır. Aynı yıl içinde Thomas Hastings ve William MacCallum John Hopkins Hastanesi’nde yatan akut endokarditli bir hastada “*Micrococcus zymogenes*” adını verdikleri dirençli bir bakteri izole etmişlerdir (Devriese, 2006). Daha sonra Alexander Gordon, hayvan dışkısı ile bulaşık olduğu düşünülen sıvı besiyerinde fekal streptokok izole ettiğini açıklamıştır. Ayrıca araştırmacı, lağım sularının bolca streptokok ihtiva ettiğini bildirmiş, bu sebeple de suların kontamine olup olmadığını araştırmada fekal streptokokların indikatör olarak kullanılabileceğini açıklamıştır (Facklam ve Teixeira 1998).

1906 yılında Harder ve Andrews, raffinozu fermente etmeyen ancak laktozu ve manitolü fermente eden gaita kökenli organizmaları tanımlama amaçlı “*Streptococcus faecalis*” ismini kullanmışlardır. Orla-Jensen ise 1919 yılında *S.faecalis*’ten farklı fermentatif özelliklere sahip bir organizma izole etmiş ve bu organizmaya da “*Streptococcus faecium*” adını vermiştir. Bu iki türün enterokokların iki ana grubu olduğu ileriki çalışmalarda açığa çıkmıştır (Ulusoy ve ark. 2012).

1930’lu yıllarda Lancefield, streptokokları sınıflandırmada kullanılan Lancefield sınıflandırmasına göre enterokokları D grubu streptokoklar grubuna yerleştirmiştir. *S.faecium*’a benzeyen fakat çok daha az fermentasyon özelliğine sahip üçüncü bir tür olarak *Streptococcus durans*, Sherman ve Helen U.Wing tarafından 1935 ve 1937 yıllarında tanımlanmıştır (Akçimen 2010).

1937–1938 yılları arasında J.M.Sherman streptokokların yüksek ısı derecesinde (45C°), pH’ı 9.6 olan ortamda veya %6.5 NaCl varlığında üreyebilme, %40 safra varlığında eskulini hidrolize edip edememe gibi özellikleri baz alarak yaptığı çalışmalarında streptokokları “*Enterococcal grup*” olarak tanımlamıştır (Devriese 2006).

1967 yılında R.H.Deibel ve S.S.Nowlan *Enterococcal* grubuna *S.avium*'u eklemiştir. 1970 yılında A.P.Kalina ise enterokokal streptokokların yeniden düzenlenip onlara bir cins oluşturulmasını ve fenotipik özellik ve hücresel dizilimleri göz önünde bulundurularak *S.faecium* ve *S.faecalis*'in “*Enterococcus*” olarak adlandırılmasını önermiştir. Fakat araştırmacının önerisi dikkate alınmayarak enterokoklar, uzun yıllar boyunca Lancefield sınıflandırmasına göre D grubu streptokoklar olarak kalmıştır (Akçimen 2010).

1980'li yılların ortalarında moleküler yöntemlerin gelişmesi ve bakteri tanımlama alanında başarıyla uygulanması sonucu enterokokların ayrı bir cins olduğu belirlenmiş ve “*Enterococcus*” cinsi olarak adlandırılmıştır (Karagöz 2005).

Bunları takiben sonraki yıllarda yapılan filogenetik analizler ve fenotipik özellikleri göz önünde bulundurularak enterokokların, *Streptococcus* ve *Lactococcus* genuslarından çok *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* genuslarına benzer olduğu gösterilmiştir (Akçimen 2010).

Yapılan gaz likit kromatografik yöntemiyle, enterokokların uzun zincirli yağ asitlerinin yapıları incelenmiş ve bunun sonucunda, *Enterococcus solitarius*'un *Tetragenococcus halophilus*, *Enterococcus seriolicida*'nın ise *Lactococcus garviae* olduğu ortaya çıkmıştır. *Enterococcus flavescens*'in de *Enterococcus casseliflavus* ile aynı tür oldukları anlaşılabilir olarak *E.casseliflavus* olarak adlandırılmışlardır (Topçu ve ark. 2002).

16S rRNA gen sekans analizi, tüm hücre protein profil analizi gibi tiplendirme yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda enterokokların *Firmicutes* filumunda, *Bacilli* sınıfında, *Lactobacilles* takımından *Enterococcaceae* ailesinde yer aldığı (Tablo 1) ve bugüne kadar en az 34 türünün var olduğu tespit edilmiştir (Bilström 2008).

**Tablo 1.** Enterokokların sınıflandırılması

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

(Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman E.W, Procop G, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology).

Belirlenen 34 tür, biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak 5 gruba ayrılır Bu türlerden bazılarının gruplara göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir (Keskin 2014).

**Grup 1:** Sorboz, sorbitol ve mannitol sıvı besiyerlerinde asit oluştururlar, fakat arjinini hidrolize etmezler. Bunlar: *E.avium*, *E.gilvus*, *E.malodoratus*, *E.pallens*, *E.pseudoavium*, *E.raffinosis*, ve *E.saccharolyticus*.

**Grup 2:** Bu gruptakiler, sorbozdan asit oluşturmazlar, sorbitollü sıvı besiyerinde reaksiyonları değişkendir, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, arjinini hidrolize ederler.

**Grup 3:** Sorboz, sorbitol ve mannitol sıvı besiyerinde asit oluşturmazlar. Arjinini hidrolize ederler. D antijeni içermezler. *E.faecalis* ve *E.faecium* grup 2'de yer almalarına rağmen, bu iki türün mannitol negatif varyantları ise grup 3'te yer alır.

**Grup 4:** Sorboz ve mannitol içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmazlar, arjinini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E.cecorum* asit oluşturur ancak *E.sulfureus* asit oluşturmaz.

**Grup 5:** Sorboz içeren sıvı besiyerinde asit oluşturmazlar iken, sorbitollü sıvı besiyerindeki reaksiyonları değişkendir. Mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, arjinini hidrolize etmezler.

**Tablo 2.** Bazı enterokok türlerinin gruplara göre ayrımı

| <b>Grup 1</b>             | <b>Grup 2</b>            | <b>Grup 3</b>      | <b>Grup 4</b>            | <b>Grup 5</b>         |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>E. avium</i>           | <i>E. casseliflavus</i>  | <i>E. dispar</i>   | <i>E. asini</i>          | <i>E. canis</i>       |
| <i>E. gilvus</i>          | <i>E. faecalis</i>       | <i>E. durans</i>   | <i>E. cecorum</i>        | <i>E. columbae</i>    |
| <i>E. malodoratus</i>     | <i>E. faecium</i>        | <i>E. faecalis</i> | <i>E. phoeniculicola</i> | <i>E. moraviensis</i> |
| <i>E. pallens</i>         | <i>E. gallinarum</i>     | <i>E. faecium</i>  | <i>E. sulfurens</i>      |                       |
| <i>E. pseudoavium</i>     | <i>E. haemoperoxidus</i> | <i>E. hirae</i>    |                          |                       |
| <i>E. raffinosus</i>      | <i>E. mundtii</i>        | <i>E. ratti</i>    |                          |                       |
| <i>E. saccharolyticus</i> |                          | <i>E. villorum</i> |                          |                       |

Enterokoklar insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde normal flora üyesi olarak bulunmaktadır. Doğada ise toprak, su, bitki, böcekler, kuşlar ve memelilerde yaygın olarak bulunur. Çevre koşullarına dayanıklı olmalarından dolayı hastane ortamında çeşitli cansız nesnelere üzerinde (yatak, stetoskop, komidin gibi.) uzun süre canlılıklarını koruyabilirler (Altaş 2002).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, bu bakterilerin normal bağırsak florasında bulunmasının hastadan hastaya, hatta hastaneler arası yayılmada temel risk faktörü olduğunu göstermiştir. 1984 yılına ait Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) verilerine göre, hastane enfeksiyonlarının oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar sıralamasında %10.4 oran ile enterokokların üçüncü sırada olduğu vurgulanmıştır (Çiçekler-Tok 2006).

Enterokokların epidemiyolojisinde önemli yaklaşım VRE üzerine yoğunlaşmıştır. Bu açıdan Avrupa ülkeleri ve ABD arasındaki farklılık dikkat çekicidir. Avrupa ülkelerinde VRE rezervuarı genelde kanalizasyon sistemi ve hayvanlar olarak düşünülüyorken ABD’de ise hastane dışında VRE enfeksiyonları sık görülmemekte ve bu yüzden nozokomiyal bir sorun olarak kabul edilmektedir. Bu epidemiyolojik farklılığın, glikopeptid antibiyotik olan avoparsinin kullanımıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Avoparsin Avrupa ülkelerinde hayvan yemlerine kümes hayvanlarının büyüme ve gelişimini hızlandırması için katılan bir

antibiyotiktir. ABD’de ise avoparsin, hayvan yemlerinde kullanımı açısından lisans almış bir katkı maddesi değildir bu sebeple kullanılmamaktadır. Ayrıca ABD’deki çiftlik hayvanlarında yapılan sürveyans çalışmalarında VRE saptanmamıştır. Bu sebeple Avrupa ülkelerinde avoparsin yasaklanmış ve VRE enfeksiyonlarında azalma olduğu görülmüştür (Gültekin 2014).

Araştırmalar ABD’deki en önemli VRE rezervuarının hastanedeki hastaların GİS kolonizasyonu olduğunu göstermiştir. VRE ile kolonize olan hastalar sıklıkla asemptomatiktir, bu sebeple yüksek risk grubuna girerler. Yüksek risk grubundan alınan sürveyans kültürleri ile kolonizasyonun saptanması mümkündür. Ayrıca VRE ile kolonize veya enfekte olmuş olan hastaların odalarındaki cansız yüzeyler ve ortak kullanıma açık tıbbi aletler gibi malzemeler sıklıkla kontamine olur ve önemli bir VRE rezervuarını oluşturur (Alp ve Şardan 2008).

VRE ilk kez 1988 yılında Fransa (Leclerg ve ark. 1988) ve İngiltere’den (Uttley ve ark. 1988) bildirilmiştir. Bunu ABD ve diğer Avrupa ülkelerindeki olgular izlemiştir. Bunları takiben VRE enfeksiyonları hızla yayılmıştır.

The National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS) tarafından yayımlanan rapora göre; 1989-1993 yılları arasındaki nazokomiyal VRE olguları ilk başlarda %0,3 iken, %7,9’a yükselmiştir. Bu oran yoğun bakım ünitelerinde %0,4’ten %13,6’ya doğru ciddi bir artışa geçmiştir. 2000 yıllarına gelindiğinde ise yoğun bakım üniteleri ve normal servislerde VRE enfeksiyonları %25’i aşmıştır. Yine NNIS’nin yayımına göre, erişkin hastalarda oluşan idrar yolu ve yara enfeksiyonlarında ikinci ve bakteriyemi oluşumunda da üçüncü sıklıkta izole edilen bakterilerin enterokoklar olduğu gösterilmiştir (Robert C. ve Moellering R.C. 2005).

Werner ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınlanan makalelerinde belirttikleri European Antimicrobial Surveillance Systems (EARSS) verilerine göre; 1998 yılında bakteriyemiden sorumlu *E.faecium* izolatları arasındaki vankomisin direnç oranları İtalya’da %10 iken, İngiltere’de %24 olarak belirlenmiştir. EARSS’in 2007 yılındaki verilerine gelindiğinde ise, VRE oranı %45’in üzerine çıkan ülkeler Portekiz, Yunanistan ve Güney Avrupa ülkeleri iken, %1’lik oranla en düşük VRE insidansının İskandinav ülkelerinde olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan Almanya EARSS verilerinde VR *E.faecalis* oranı hem 2001 hem 2007 yılında %1’in altında

kalmışken, vankomisin dirençli (VR) *E.faecium* oranı 2001 yılında %1, 2007 yılında ise %15'e çıkmıştır. Fransa'da ise glikopeptid grubu antibiyotiklere direnç gösteren *E.faecium* oranı 2005 yılında %5 olarak bildirilmiştir. 2007 yılında yayımlanan İngiltere verilerine bakıldığında bakteriyemi enfeksiyonlarındaki VRE oranı %8,5-12,5 arasında bulunmuştur.

Türkiye'de ise ilk VR *E.faecium* suşu Vural ve arkadaşları (Aktaş ve Derbentli, 2009) tarafından Akdeniz Üniversitesi'nden bildirilmiştir. Suş, bronkopulmoner enfeksiyonu olan bir bebekten alınan plevra sıvısından izole edilmiştir. Bunu aynı yıl içinde yapılan bildirimler takip etmiştir (Aktaş ve Derbentli 2009).

Enterokoklar ve VRE'ler ile oluşan hastane kökenli enfeksiyonların risk faktörleri detaylı araştırılmıştır (Taşbakan 2010, Çelebi 2008). Bunlar arasında demografik risk faktörleri olarak hastanede yatış süresi, VRE ile kolonize veya enfekte olan hastanın yakınında bulunması, VRE ile kolonize veya enfekte olan hastayla ilgilenen hemşireden bakım alınması ve VRE ile kontamine olmuş olan aletlerle temas düşünülmüştür. Antimikrobiklerle ilgili faktörler açısından kullanılan antibiyotikler (vankomisin, 3.kuşak sefalosporin, kinolon, anti-anaerob antibiyotik, aztreonam), antibiyotik tedavisinin miktarı ve süresi ve operasyon öncesi bağırsak hazırlığı düşünülmüştür. Altta yatan bir başka hastalıkla ilgili risk faktörleri ise yakın zamanda ameliyat geçirmiş olmak, immünsüpresyon veya organ alıcısı olmak, yüksek APACHE II skoruna sahip olmak, böbrek yetmezliği, hepatobilyer hastalık, *Clostridium difficile*'e bağlı kolit ve enteral beslenme şeklindedir (Taşbakan 2010).

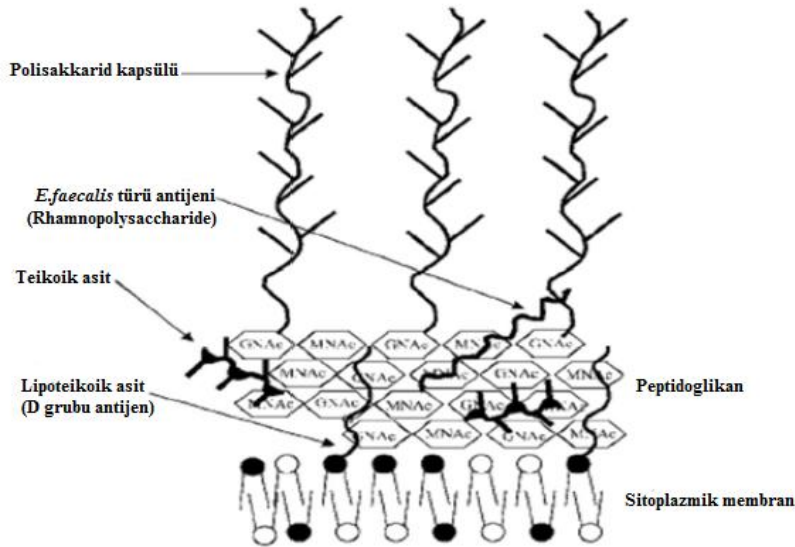
## 2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterokoklar insanların GİS'inde, bitkilerde, böceklerde, dışkı ile kontamine olmuş olan toprak, yiyecek ve sularda bulunur. Enterokoklar içme sularında fekal kontaminasyonun gösterilmesinde indikatör olarak kullanılırlar. Ayrıca laktik asit ürettiklerinden dolayı peynirlerde başlatıcı olarak da kullanılmaktadırlar. Bu sebeple, peynirlerden, et ürünlerinden ve diğer bazı yiyeceklerden izole edilebilirler. İnsan dışkısında çoğunlukla *E.faecalis* ( $10^5$ - $10^7$  CFU/gr), hastane ortamında ise *E.faecium* ( $10^4$ - $10^5$  CFU/gr) izole edilme oranı daha fazladır. Bu oranlar çeşitli faktörlerin etkisine bağlı olarak değişiklik gösterebilirler (Ural 1998, Akdemir 2010).

### 2.2.1. Hücre Duvarı ve Antijenik Yapısı

Enterokokların hücre duvarı üç bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Peptidoglikan polimerleri glikan zincirler ve bu zincirlere bağlanan L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala kısa yapıli pentapeptitlerden oluşmaktadır. Pentapeptitler komşu peptitlerle çapraz bağlanma yaparlar. Bu yapı hücre duvarının %40'ını oluşturmaktadır. Bunun dışında kalanlar teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Teikoik asit ribitol, polisakkaritler de ramnoz içermektedir. Peptidoglikan dışındaki yardımcı polimerlerin yapısı hala bilinmemektedir (Öncül 2010).

Lipoteikoik asit (LTA)'in antijenik özellikleri göz önünde bulundurularak enterokokların serolojik tiplendirilmesi yapılmaktadır. LTA içerdiği "D antijeni" ile enterokokların D grubu enterokoklar olarak gruplandırılmasını sağlamıştır. D antijeni yüksek oranda glukoz içermektedir ve poligliserolfosfatın teikoik asit polimeridir (Murray 1990, Kasaroğlu 2013).



Şekil 1. *E.faecalis*'in hücre duvarındaki polimerlerin şematik şekli (Akçimen 2010).

### 2.2.2. Üreme ve Fizyolojisi

Enterokoklar gram pozitif, katalaz negatif (bazı türleri "pseudo catalase" denen yalancı pozitiflik gösterebilir), ve hareketsiz yapıda (*E.casseliflavus* ve *E.gallinarum* hariç) olup mikroskopisinde tek tek veya çift ya da kısa zincirler halinde görülen koklardır (Sedgley ve ark. 2005).



Fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısıları 10-45°C arasında, optimal pH'ları ise  $7.2 \pm 0.2$ 'dir. Koyun kanlı agarda 24 saatlik inkübasyonun ardından 1-2mm çapında, beyaz-gri, düzgün yüzeyli, alfa, beta, veya non-hemolitik koloniler oluştururlar. Koloni tipleri streptokoklara benzer ancak genelde streptokoklardan daha büyüktür. Buna rağmen morfolojik olarak streptokoklardan ayırmak güçtür (Akçimen 2010).

*E.faecalis*'lerin bir kısmı insan, tavşan ve at kanı agarda  $\beta$ -hemoliz oluşturabilirken koyun kanlı agarda hemoliz oluşturmazlar. Fakat bazı *E.durans* türleri tüm kanlı agarlarda  $\beta$ -hemoliz oluştururlar. Bunların dışında diğer enterokok türlerinin tamamı  $\alpha$ -hemolitik veya non-hemolitikdir.  $\alpha$ -hemoliz yapan suşlar gerçekte non-hemolitiklerdir ve peroksit üretirler. Besiyerinde oluşan yeşil renk  $\alpha$ -toksin üretimi sonucu değil, eritrositlerdeki peroksitin etkisiyle oluşmaktadır. *E.casseliflavus*, *E.gilvus*, *E.mundtii*, *E.pallens* ve *E.sulfureus* ise kanlı agarda sarı pigment oluştururlar (Winn ve ark. 2006).

Enterokoklar yüksek ısı, tuz ve safra tuzlarını tolere ederler, %6,5 NaCl ve %40 safra tuzu varlığında üremeye devam ederler. Eskulini hidrolize etme özellikleri vardır, dolayısıyla Bile esculin agar (BEA)'da rahatlıkla ürerler. *E.cecorum*, *E.columbae*, *E.pallens* ve *E.saccharolyticus* dışında birçok türü Pyrolidonyl arilamidase (PYRase) üreterek Pyrolidonyl- $\beta$ - naphthylamide (PYR)'i hidrolize ederler. Ayrıca tüm suşları Leucine aminopeptidase (LAPase) aktivitesine sahiptir ve leucine  $\beta$ -naphthylamide (LAP)'i hidrolize ederler (Bilgehan 2002, Başustaoğlu 2010).

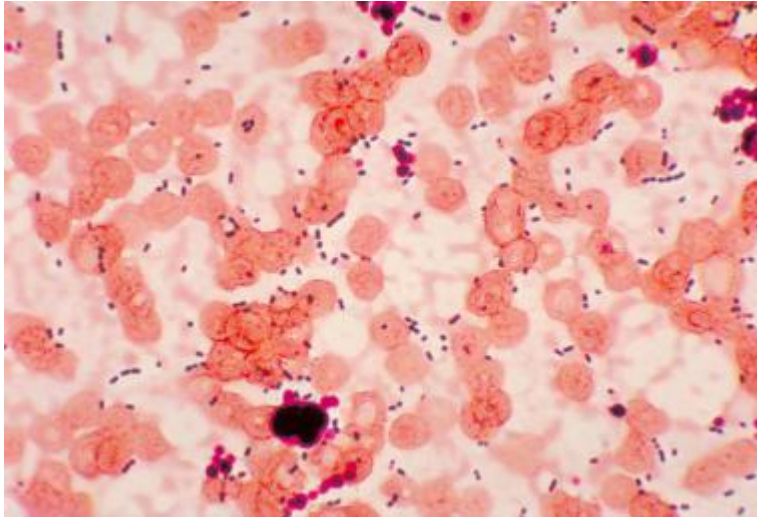
Enterokoklarla birlikte gram negatif bakterileri de ihtiva eden karışık örneklerden enterokokları izole edebilmek için seçici besiyerleri kullanılır. Bunlar; azid içeren Bile esculin acid (BEA) agar, Enterococcosel agar, Columbia-colistin-nalidixic acid agar (CNA) ve Phenylethyl alcohol agar (PEA)'dır. Koloni rengi seçici besiyerlerinin içerdikleri kimyasal maddelere göre değişiklik gösterebilir. Örnek olarak BEA agar eskulin içerdiği için enterokok kolonileri siyah halka ile çevrilmiş, gri-beyaz koloniler tipinde görülürken, tetrazolium tuzlarını içeren agarda kolonilerin ortasında tuğla kırmızısı rengi oluşur (Korten 2002, Murray ve ark. 2010).

Enterokoklar metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmek için B1, B6 ve B12 vitaminlerine, bir karbon kaynağına ve nükleik asit bazlarına gereksinimleri vardır. Bazı türler çoğalmaları için arjinin, glutamat, glisin, lösin ve valin-e ihtiyaç duyarken, *E.faecalis* histidin, izolösin, metionin ve triptofan-a ihtiyaç duymaktadır. Bazı türlerin ise bu aminoasitlerin hiçbirine gereksinimleri yoktur (Svec ve ark. 2001).

Enterokoklar porfirin prekürsörleri sentezleyemedikleri için sitokrom enzimleri eksprese olmaz ve bu yüzden katalaz negatiftirler. Bazı *E.feacalis*'ler kanlı agarda üretildiğinde zayıf sitokrom aktivitesi gösterebilir ve zayıf katalaz pozitifliğe sebep olabilirler. Bunun dışında *E.haemoperoxidus* türlerinde katalaz pozitiflik saptanmıştır. Suşların hiçbiri gaz oluşturmaz, hepsi homofermentiftir ve glukoz fermentasyonunda son ürünleri laktik asittir (Svec ve ark. 2001, Akçimen 2010).

### 2.2.3. Boyanma ve Görünümü

Anilin boya ile kolayca boyanırlar, gram pozitiflerdir. 0,5-1µm çapında, tek tek veya çift halde kısa zincirler oluşturmuş yuvarlak, kokobasil, oval şekillerde görülebilirler. Katı besiyerinden hazırlanan preparatlarda bakteriler kok veya kokobasil şeklinde görülürken, sıvı besiyerinden hazırlanan preparatlarda genelde diplokok veya kısa zincirler oluşturmuş olan oval koklar görülmektedir. *E.casseliflavus* ve *E.gallinarum* dışındaki türleri hareketsiz yapıdadır (Akan 2004).



**Şekil 2.** Enterokokların gram boyama sonucu mikroskopta görüntüsü (Sayiner 2008).

#### 2.2.4. Genom ve Genetik Bilgi Transferi

Enterokoklar genlerinin çoğunu çeşitli türlerden, özellikle *Streptococcus* ve *Staphylococcus* cinsleri ile oluşan lateral gen transferleriyle kazanmışlardır. ABD’de bulunan The Institute of Genomic Research (TIGR) ve Joint Genomic Institute of the Department of Energy laboratuvarlarında hastanelerde sıkça izole edilen ve enfeksiyonlara sebep olan *E.faecalis*, *E.faecalis* V583, ve *E.faecium*, *E.faecium* ATCC BAA-472 suşlarının gen dizi analizleri üzerine çalışmalar yapılmış ve tam genom dizi analizleri belirlenmiştir. Enterokokların G+C bakımından içerikleri %37-%45 arasında bulunmuştur (Tendolkar ve ark. 2003).

*E.faecalis* V583 suşu *VanB* fenotipi gösteren ilk VRE suşudur. Bu suşun baz çifti (bç) 3 218 031 uzunluğundadır ve üç 182 ORF (açık okuma penceresi) bölgesine sahiptir. *E.faecalis* V583 genomu mobil ya da eksojen gen olarak kazanılmış olan DNA dizilerinden oluşur. Bu diziler genomun %25’ini oluşturmaktadır. Kazanılan bu mobil elementler integre plazmid genleri, patojenite adaları, konjugatif ve kompozit transpozonlar, faj bölgeleri ve çok sayıda insersiyon dizilerinden oluşmaktadır. Bu mobil elementlerin suş tarafından kazanımı ilaç direncinin suşta oluşmasına ve diğer suşlara yayılımına katkı sağlamaktadır. Kromozomda DNA dışında *E.faecalis* V583 suşu üç tip plazmid de içermektedir. G+C oranı %34 civarında olan bu plazmidlerin büyüklükleri 66 320 bp, 57 660 bp ve 17 963 bç’dir (Shankar ve ark. 2006).

*E.faecium* genomu ise 2 928 706 bp büyüklüğündedir. 3 309 ORF içeren genomun G+C oranı %37,8’dir. Enterokok türlerinin çoğu antibiyotiklere doğal dirençlilik göstermektedir. Plazmid ve transpozonlar aracılığı ile kazanılan bu direncin diğer bazı suşlara da aktarılması çoklu antibiyotik direncinin oluşmasını sağlamıştır. Vankomisine direnç genleri plazmidlerde kodlanmaktadır. Direnç genlerinin plazmidlerle laboratuvar ortamında *S.aureus* suşlarına başarıyla aktarılması, doğada vankomisine dirençli *S.aureus* suşlarının oluşabileceği korkusunu yaratmıştır (Akçimen 2010).

Vankomisin glikopeptit antibiyotikler grubundadır. 1950’li yıllarda *Streptomyces orientalis* bakterisinden elde edilen bu antibiyotik denendiği tüm stafilkokların ölümüne yol açtığı için “yenen” anlamını taşıyan “vanquish” kelimesinden adını almıştır. 1 448 dalton büyüklüğünde karmaşık bir molekül olan

vankomisinin yapısı ancak 1970 yılında netlik kazanmıştır. Yapı iki-beta hidroksiklorotiazin, üç fenilglisin, bir N-metillisin ve bir aspartik asit amidinin oluşturduğu yedi alt ünitli peptid zinciri ve bu zincire bağlanan glikoz ve vankozaminin oluşturduğu bir disakkaridden oluşmaktadır (Murrey 1997).

Vankomisin gram negatif bakterilerin hücre duvarından sahip olduğu molekül büyüklüğü yüzünden geçemediği için gram negatiflere etkisizdirler yani gram negatifler vankomisine intrinsik (doğal) dirençlidirler. Bunun dışında vankomisinin hemen hemen tüm gram pozitif aerob ve anaerob bakterilere karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Vankomisin bu bakterilerin peptidoglikan sentezi sırasında N-asetil glikozamin-N-asetil muramik asit disakkaridindeki muramik aside bağlı olan pentapeptid zincirinin sonunda bulunan D-alanil-D-alanil dipeptidine bağlanarak etki ederler. Bu bağlanma sonucu peptidoglikan sentezi için gerekli olan transpeptidasyon ve transglikolizasyon aşamaları engellenmiş olur. Tüm bu aşamaların sonucunda hücre duvarı sentezi engellenerek bakterinin lize olması sağlanır (Aktaş ve Derbentli 2009).

Enterokoklarda intrinsik (doğal) ve ekstresek (kazanılmış) olarak iki tip direnç söz konusudur. İlaç direnci veya virulansla ilgili genlerin taşınmasında çok sayıda plazmid, patojenite adası, insersiyon dizileri, faj bölgesi ve transpozonlar rol almaktadır. Genetik bilgi transferiyle ilgili üç tip plazmid tanımlanmıştır. Bunlar Feromon-responsive plazmid, Inc18 plazmid ve Rolling circle replicating plasmid (RCR)'dir. Bunlardan feromon-responsive plazmidin replikasyonu sadece enterokok türleriyle özellikle *E.faecalis* suşuyla sınırlıyken, Inc18 ve RCR plazmidleri pek çok türde replike olabilmektedir (Çöleri ve Çökmüş 2008).

Plazmid içermeyen alıcı suşlar feromon ile plazmid aktarımını gerçekleştirirler. Plazmid bulunmayan alıcı suş ekstraselüler feromon sentezler. Buna tepki olarak verici suş proteinöz bir madde salgılar. Bu madde verici suşta agregasyon faktör (AF) tarafından salgılanır. Bundan sonra AF alıcı hücrenin yüzey kısmına bağlanır ve alıcı ile verici hücrenin yaklaşması sağlanır. Yakınlaşma sonucu plazmid değişimi gerçekleşmiş olur. Feromon aracılığı ile yapılan bu transfer, plazmid geçişini  $10^5$ - $10^6$  kat arttırmaktadır (Çöleri ve Çökmüş 2008).

Feromonlar dışında enterokoklar konjugatif transpozonlar aracılığı ile de genetik bilgi transferi yapabilirler. Transpozonlar sıklıkla eritromisin, gentamisin, kanamisin ve tetrasiklin gibi aminoglikozidik antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç genlerini taşırlar. Örnek olarak *E.faecalis*'lerde tetrasiklin direnci konjugatif transpozon Tn916, vankomisin direncini kodlayan VanA genleri Tn1546, VanB operonu ise Tn1547, Tn1549 ve Tn5382 tarafından taşınmaktadır. Ayrıca yüksek düzey gentamisin direncinden sorumlu olan *aac(6')* *leaph(2'')* Ia geni de Tn5281 tarafından kodlanmaktadır (Çiçekler-Tok 2006).

Transpozonlar çok geniş konak spektrumuna sahiptirler. Enterokoklar dışında streptokoklar, laktokoklar ve diğer gram pozitif bakterilerde de bulunurlar (Ulusoy ve ark. 2006, Singh ve ark. 2006).

**Tablo 3.** *E.faecalis* suşlarında bazı tip transpozonların kodladığı bölgeler

|        |  |
|--------|--|
| Tn 916 | Tetrasiklin direnci                      |
| Tn1546 | VanA gen kümesi                          |
| Tn1547 | VanB operonu                             |
| Tn1549 | VanB operonu                             |
| Tn5382 | VanB operonu                             |
| Tn5281 | <i>aac(6')</i> <i>leaph(2'')</i> Ia geni |

### 2.3. İdentifikasyon

Hastane enfeksiyonlarında önemli sorun olan enterokokların sürveyansının düzenli olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Etkenlerin identifikasyonunun ve antibiyotik duyarlılıklarının erken ve doğru bir şekilde verilmesi kontrol önlemlerinin erken dönemde alınabilmesini ve yayılımının sınırlanmasını sağlayabilmektedir. Suşlar arasındaki klonal ilişkinin moleküler yöntemlerle ortaya konması da enfeksiyonun kontrolü ve takibi açısından önem taşımaktadır. Vankomisine direnç mekanizmaları ile artan dirençli enterokokların tür tayininin yapılması, virulans genlerinin araştırılması; virulansını sağlayan bu yapıların inaktive edilmesi, yeni tedavi

protokollerinin ve alınacak enfeksiyon önlemlerinin geliştirilmesine yararlı katkılar sağlayacaktır (Ustaçelebi 1999).

Biyokimyasal testler ve antibiyotik duyarlılık testleri gibi fenotipik testlerin kısıtlı sayıda enterokok tayin etmeleri, iş yükü, ekonomik maliyetinin yüksek olması, farklı özelliklerin ortaya çıkarılması için çeşitli modifikasyonlar gerekliliği ve duyarlılıklarının PCR yöntemlerine göre daha düşük olması gibi dezavantajları vardır. Ancak bunlara rağmen bile fenotipik yöntemlerin yararsız olduğunu söylemek mümkün değildir (Çetinkaya ve Ayhan 2012).

Diğer taraftan nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin enterokokların virulans karakterizasyonunda kullanımı fenotipik yöntemlere göre daha duyarlı, hızlı ve biyogüvenlikli olmakla birlikte aynı anda birden fazla türü tayin etme gibi özelliklere sahiptir ve fenotipik yöntemlere istinaden tavsiye edilmektedir. Birçok avantajına rağmen gelişmiş laboratuvarlar dışında birçok laboratuvar PCR'ın zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olduğunu savunmaktadır. Ek olarak altyapı yetersizlikleri, standardizasyonun olmayışı gibi sebepler yüzünden genotipik yöntemler çok fazla kullanım alanı bulamamışlardır. Ancak tüm bunlara rağmen gelecek vaad eden yöntemler arasında yerini almıştır (Yerlikaya 2014).

Fenotipik metodlara kıyasla daha güvenilir sonuçlar veren genotipik metodların en önemli avantajları ise şunlardır (Çetinkaya ve Ayhan 2012):

- Güçlü ayırım yeteneğine sahiptirler, tüm farklı polimorfik özellikleri ortaya koyarlar
- Basit, ucuz, hızlı ve duyarlı yöntemlerdir
- Standardize edildikleri zaman stabil karakterlerdir
- Benzer solusyonlar ve prosedürler kullanılarak bakteriler dışında virüs, mantar ve parazitler gibi farklı mikroorganizma türleri için kullanılabilirler

### **2.3.1. Cins Düzeyinde Sınıflandırma**

Koloni tipi ve gram boyama mikroskopisi göz önünde bulundurularak enterokok olduğu şüphelenilen bakteri kolonisi rutinde belirli testlere tabi tutularak enterokok olduğuna dair onaylama aşamalarına gidilir (Şekil 3).

Şüpheli kolonilere KATALAZ testi yapılır.

Katalaz testi negatif veya zayıf pozitif ise,

PYR, safra eskulin hidrolizi testi ve %6.5 NaCl ile 45°C'de üreme testi yapılır.

PYR, safra eskulin hidrolizi testi pozitif ve %6.5 NaCl ile 45°C'de üreme varsa,

*Enterococcus spp.* olarak rapor edilir.  
Sonrasında tür ayrımı için diğer bazı biyokimyasal ve fenotipik bazı testlerden yararlanılır.

### Şekil 3. Enterokokların tanımlanmasında izlenmesi gereken aşamalar

#### a) Katalaz Testi:

Aerob ve fakültatif anaerob bakterilerin çoğu aerobik solunumun son ürünü olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluştururlar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in üreme ortamında birikmesi mikroorganizmalar için toksik etkili olduğundan bazı organizmalar bunu önlemek amacıyla katalaz enzimini üretirler. Tüm enterokoklar katalaz negatiftirler. Bazı durumlarda zayıf da olsa yalancı pozitiflik gösterebilirler (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 2014).

#### b) Optokin duyarlılık testi:

Optokin kinin derivativesidir. Genelde pnömokokları enterokoklar da dahil olmak üzere streptokoklardan ayırmada kullanılır. Pnömokoklar optokinin düşük konsantrasyonlarına bile duyarlıyken enterokoklar ve streptokoklar (*S.oralis*, *S.mitis* ve *S.pseudopneumoniae* hariç) dirençlidirler. Kanlı agara 0,5 McFarland bulanıklığındaki koloni ekimi ve 24 saatlik inkübasyon soununda diskin etrafında üreme olması European Centre for Disease Prevention and Control (EUAST) rehberine göre dirençli olarak kabul edilmektedir (Taşova 2004).

#### c) Basitrasin duyarlılık testi:

Basitrasin *Bacillus subtilis* bakterisinin bazı suşları tarafından üretilmiştir. Bu antibiyotik birçok gram pozitif bakteriye karşı etkilidir. Basitrasin testi, enterokoklar ile Grup A β-hemolitik streptokokların ayrımında kullanılır. Grup A β-hemolitik streptokoklar basitrasine duyarlıyken enterokoklar dirençlidirler. Kanlı agara 0,5Mc

Farland bulanıklığındaki koloni ekimi ve 24 saatlik inkübasyon sunucunda diskin etrafında üreme olması EUCAST rehberine göre dirençli olarak kabul edilmektedir (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 2014).

d) PYR hidroliz testi:

Bazı bakteriler PYRase enzimi üretirler. PYR maddesi de bu enzimin saptanmasında substrat olarak rol oynar. PYR maddesinin potansiyel karsinojen olduğu saptanmıştır. Bu sebeple artık günümüzde substratın laboratuvarında hazırlanması yerine piyasada yaygın olarak bulunan hazır ticari kitler kullanılmaktadır. Bu kitler substrat emdirilmiş PYR diskleri içerir. Bazı kitlerde ise sıvı substrat emdirilmiştir (Ergin ve ark. 1995, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 2015).

e) Safra-Eskulin hidroliz testi:

Bu test için kullanılan safra-eskulin besiyeri hem seçici hem ayırt edici bir besiyeridir. Safra seçicilik özellik kazandırırken, eskulin hidrolizi ayırt edici özelliği gösterir. Safra varlığında üreyen bazı organizmalar eskulini hidrolize eden enzimlere sahiptirler. Safra-eskulin testi özellikle enterokokları ve *Streptococcus bovis* grubu bakterileri diğer streptokoklardan ayırmada kullanılır. Her iki cins de eskulini hidrolize ederler (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 2015).

f) Isı-Tuz tolerans testi:

Çeşitli organizmaların, enterokoklar da dahil olmak üzere değişik NaCl konsantrasyonlarında üreme potansiyelleri tanımlamada kullanılan özellikler arasındadır. %6,5 NaCl'de üreme testi enterokokları diğer streptokoklardan ayırmada kullanılır ve PYR testinin alternatifi olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla kullanılan tuz tolerans besiyeri kalp infüzyonu, glikoz ve %6,5 NaCl içerir; indikatör olarak ise bromkrezol moru bulunmaktadır. Tuz tolerans testi eskulin testi ile enterokokları grup D streptokok türleri olan *Streptococcus bovis* ve *Streptococcus equinus*'dan ayırt etmede kullanılır. Tuz testi dışında enterokoklar 45°C gibi yüksek ısıda da üreme yeteneğine sahiptirler (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları 2015).



g) Streptokok grup testi:

Enterokoklar D grubu streptokoklar içinde yer alır. Bu sebeple Lancefield A, B, C, D, F, ve G sınıflandırmasında ticari olarak temin edilen grup antijenleri ile tanımlanabilirler. Testin uygulanması ve sonucunun okunması üretici firmanın önerdiği şekilde yapılmalıdır. *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve bazı *Vagococcus* türleri de grup D antijeni ile reaksiyon verebileceğinden dolayı çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Bu yüzden antijen testinin bir diğer testle teyit edilmesi gerekmektedir (Bilgehan 1990).

### 2.3.2. Tür Düzeyinde Sınıflandırma

Enterokokların tür düzeyinde sınıflandırılması esas olarak nükleik asit dizilimi ile yapılmaktadır. Bu yöntem zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olduğundan karbonhidrat fermentasyon testleri, biyokimyasal testler, antibiyotik duyarlılık profilleri gibi fenotipik testlerden yararlanılarak tür tanımı yapılabilmektedir. Bahsedilen testler dışında ticari olarak temin edilebilen kromojenik agar besiyerleri de tür tanımlama ve vankomisin direncini tayin etmede kullanılabilir (Arda 2011).

a) Antibiyotik duyarlılık profilleri:

Hastane enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilen *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarının ayırımında antibiyotik duyarlılık profillerinden faydalanılır. *E.faecium* ampisiline doğal dirençli, kinupristin-dalfopristine duyarlı iken *E.faecalis* ampisiline duyarlı, kinupristin-dalfopristine doğal dirençlidir. *E.faecalis* suşlarında ampisiline doğal dirençlilik yoktur (Altaş 2002).

b) Biyotiplendirme:

Biyotiplendirme mikroorganizmanın karbonhidrat fermentasyon özelliği, enzim aktiviteleri, enerji metabolizması gibi fizyolojik ve metabolik özelliklerinin araştırılması durumudur. Bu amaçla bir-çok yarı otomatize veya tam otomatize sistemler geliştirilmiştir. Örnek olarak 1989 yılında Facklam ve Collins 20 temel fenotip özelliği test eden identifikasyon sistemleri geliştirmişlerdir. Bunları takiben farklı araştırmacılar farklı sistemler geliştirse de son olarak diğerlerine göre daha az sayıda yani dokuz fenotipik özelliği test eden identifikasyon sistemi Day ve

arkadaşları (Akçimen 2010) tarafından 2001 yılında *E.faecalis* ve *E.faecium*'u ayırma amaçlı geliştirilmiştir.

API 20S ve API Rapid ID32 STREP gibi yarı otomatize sistemler yansira, VITEK sisteminin gram pozitif tanımlama sistemi (BioMerieux, Fransa) sık kullanılan tam otomatize tanımlama yöntemidir (Day ve ark. 2001).

### 2.3.3. Moleküler Testler

Rutin laboratuvar incelemelerinde fenotipik testler hala kullanılmakta olup günümüzde artık moleküler teknikler üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Nükleik asitler gibi hedef bölge bazlı moleküler yöntemler izolatın karakterizasyonunu ortaya çıkararak tam olarak klonal düzeyde ayırımını sağlamaktadır (Son ve ark. 1999, Akçimen 2010).

a) Restriksiyon enzim analizi (REA) bazlı teknikler:

- Ribotipleme
- Plasmid DNA profil analizi
- Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

b) Nükleik asit amplifikasyonu bazlı teknikler:

- PCR bazlı teknikler
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
- Intergenic rRNA Spacer PCR (ITS-PCR)
- Random Amplification of Polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR)
- Repetitif PCR (Rep-PCR)
- Specific and Random Amplified PCR (SARA-PCR)
- Diğer amplifikasyon bazlı teknikler

c) Dizi analizi teknikleri:

- Parsiyel dizi analizi
- Multilocus sequence typing (MLST)

### 2.3.3.1. REA Bazlı Teknikler

Bu yöntemde mikroorganizmaların izole edilen DNA'ları uygun bir veya birkaç restriksiyon enzimi tarafından kesilir ve elde edilen DNA fragmanları agaroz jelde bant büyüklüklerine göre ayrıştırılarak tiplendirilir. 1998 yılında Savor ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada klinik örneklerden izole edilen *E.faecium* suşları REA ve PFGE yöntemleri ile incelenmiş ve sonuç olarak her iki yöntemin de ideal olmadığını belirtmiştir (Akçimen 2010).

#### a) Ribotipleme:

Mikroorganizmaların 16S, 23S ve 5S rRNA genleri arasında spacer bölgeleri bulunur. Bu yöntem rRNA operonundaki farklı büyüklüklere sahip spacer bölgelerini hedef alır. Görüntüleme aşamasında suşların çok sayıda spacer bölgesi içermesinden kaynaklı olarak çok sayıda bant elde edilir. Bu yöntem *E.faecium*, *Listeria monocytogenes* ve Enterobakterlerin tiplendirilmesinde kullanılır. Ancak *E.faecium* en az 4 farklı tipte intergenik spacer içerdiği için bu yöntemin *E.faecium* tiplendirilmesinde ideal olmadığı kanısına varılmıştır (Singh ve ark. 2006).

#### b) Plazmid DNA profil analizi:

Bu yöntemde plazmid DNA izole edildikten sonra ilk aşama olarak REA veya PFGE gibi spesifik bir enzimle muamele edilir ardından agaroz jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılıp tiplendirilir. Yöntemin en önemli dezavantajlarından biri ise plazmidlerin fermentasyon veya diğer işlemler sırasında kaybolabilme ihtimali ve konjugatif transfer ile yeniden düzenlenebilme ihtimalidir (Arda 2011).

#### c) PFGE:

PFGE yöntemi REA'ndekine benzerdir. Ancak REA'de genomda bilinen tek bir spesifik bölgenin amplifiye edilip oluşan kısa ampikonların yerine total genomun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek oluşan bant çeşitliliğinin değerlendirilmesi esasına dayanır.

Bu yöntemle 50kb'dan daha büyük DNA molekülleri bile kolayca ayrıştırılabilmekte ve genomun tamamı değerlendirilebilmektedir. Ayrıca elde edilen bant paternlerine göre kromozomal DNA'nın büyüklüğü tahmin edilebilmekte ve suşların klonal olarak ilişkilendirilmesi mümkün olabilmektedir. PFGE yüksek ayırım

gücüne sahip bir yöntem olup, kolay yorumlanabilir ve sonuçları tekrarlanabilir özelliklerde olduğu için özellikle hastane enfeksiyonlarının sürveyans çalışmalarında referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Yöntemin pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması, zaman alıcı olması ve hala pek çok tür için standart protokollerin hazırlanmamış olması en önemli dezavantajları arasındadır. (D'Agata 2001, Arda 2011).

### 2.3.3.2. Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı Teknikler

Bilinen gen bölgelerinin (direnç, virulans genleri gibi) amplifikasyonu esasına dayanır. Mutasyonların belirlenmesinde de faydalı teknikler arasındadır.

#### a) PCR bazlı teknikler:

PCR özgün ve güvenilir bir yöntem olup bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler ve ısıya dayanıklı enzimler aracılığıyla laboratuvar ortamında çoğaltılmasını hedefler. Hedeflenen genetik materyal, çok az sayıda ve ilgisiz DNA moleküllerinin arasında olsa da seçilip çoğaltılır, homojen bir DNA materyali haline getirilir ve böylelikle kolayca tanımlanabilir hale getirilmiş olur (Çetinkaya ve Ayhan 2012).

#### b) AFLP:

Yöntem total genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilip oluşan açık uçlu DNA fragmentlerine ligaz enzimi ile uyumlu oligonükleotid adaptörlerinin bağlanmasını ve bu bağlanma sonucunda fragmentlere yerleştirilen oligoları hedef alan primerler kullanılarak bu oligoların amplifikasyonu esasına dayanır. Klasik PCR yöntemindeki gibi bu yöntemde de ampikonların tiplendirilmesi agaroz jelde veya kapiller elektroforezle olmaktadır (Arda 2011).

#### c) ITS-PCR:

Bu yöntemde enterokoklara özgü olan 16S ve 23S rRNA arasında yer alan spacer bölgeleri hedef alan primerler kullanılır. Amplifikasyon sonrasında elde edilen ampikonlar yüksek rezolüsyonlu %6 non-denatüre akrilamid-bisakrilamid jel elektroforeziyle incelenir. Bu yöntemle *E.avium*, *E.faecalis*, *E.hirae*, *E.malodoratus*, *E.pseudoavium* ve *E.raffinosis* izolatları incelenerek hepsinin benzer profile sahip olduğu gösterilmiştir. Daha ayırt edici bir sonuç elde etmek için bir diğer incelemede

amplikonlar *Sau3A1* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir ancak bunun sonucunda *E.casseliflavus*, *E.durans*, *E.faecium*, *E.hirae* ve *E.mundti* fragment tiplerine göre ayırt edilebilmişken *E.gallinarum* için spesifik bir fragment tipi gözlenememiştir (Park ve ark. 1999, Akçimen 2010).

d) RAPD-PCR:

Yüksek Mg<sup>+</sup> konsantrasyonu ve düşük bağlanma ısısında hazırlanan rastgele seçilmiş primerlerin bakteri DNA'sına rastgele bağlanarak DNA-primer hibridinin oluşumunun sağlanması ve bu DNA-primer hibridlerinin amplifikasyonu sonucunda oluşan DNA fragmentlerinin tiplendirilmesini esas alan PCR yöntemidir. RAPD-PCR, düşük bağlanma ısısının tercih edilmesi ve tek yerine iki primer kullanımı ile klasik PCR'dan farklıdır. Bu yöntemin klinik ve gıda örneklerinden izole edilen enterokokların tiplendirilmesine ek olarak hastane enfeksiyonları sürveyansında da kullanımının güvenilir olduğu gösterilmiştir. Ancak yüksek düzey aminoglikozid direncine sahip izolatların tiplendirilmesinde tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu da bildirilmiştir (Doming ve ark. 2003).

e) Rep-PCR:

Bakteriyel genomda değişik uzaklıklarda dağıtık olarak bulunan, cins ve türlere göre farklılıklar gösteren tekrarlayan DNA dizilerinin kopyalarının PCR yöntemiyle gösterilmesi esasına dayanır. Yöntemde bu tekrarlayan DNA dizilerini hedef alan primerler kullanılır ve amplifiye edilirler. Amplifikasyon sonucu farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentler spesifik DNA fingerprinting (DNA parmak izi) olarak değerlendirilir (Devriese ve ark. 2002).

f) SARA-PCR:

VanA primer seti kullanımına dayalı bir yöntemdir. Tek bir reaksiyonda *vanA* geninin gösterilmesi ve enterokok türlerinin tanımlanmasını sağlar (Akçimen, 2010).

g) Diğer amplifikasyon bazlı teknikler:

- Amplified rDNA analysis (ARDRA)
- PCR amplified 16S rDNA-RFLP
- Broad range PCR-RFLP

- Temporal temperature gradient gel elektroforesis (TGGE)
- Denaturing gradient gel elektroforesis (DGGE)
- tRNA-intergenik length polimorfizm analizi (tRNA-PCR)
- Nükleik asit hibridizasyonu
- Reverse transcription PCR (RT-PCR)

gibi teknikler de çeşitli çalışmalarda denenmiş ve günümüzde hala kullanım alanı bulunan yöntemlerdir.

### **2.3.3.3. Dizi Analizi Teknikleri**

Enterokoklar da dahil olmak üzere diğer bütün mikroorganizmalarda tek nokta mutasyonlarına dayalı bilinen ve bilinmeyen özellikleri incelemede kullanılan yöntemlerdir. Epidemiyolojik metodlar içinde en yüksek ayırım gücüne sahiptir. Cins ve tür ayırımına ek olarak izolatların klonal ilişkilerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır. Parsiyel dizi analizi: Enterokokların tiplendirilmesinde güvenilir bir yöntem olup VRE'lerin tiplendirilmesinde Multipleks PCR ile kombine olarak kullanılmıştır. MLST: Moleküler epidemiyolojik özelliklerin yanısıra bir-çok bakterinin virulans faktörlerinin de belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Enterokoklarda *E.faecium* suşlarının uluslararası veri bankasını oluşturmada ideal teknik olduğu kanısına varılmıştır. (Park ve ark. 1999, Homan ve ark. 2002).

### **2.4. Patojenite ve Virulans Faktörleri**

Enterokoklar canlıların GİS'nde kommensal olarak bulunmasına rağmen bazı predispozan durumlarda patojen olarak davranarak çeşitli hastalıklara sebep olabilirler. Enterokoklar, *S.aureus*, *S.pyogenes* ve diğer bazı mikroorganizmalar kadar intrinsik virulansa sahip değildirler. Organizmaların çeşitli genetik bilgi transferi yöntemleriyle direnç ve virulans genlerini kazanmaları onları daha virulan yapar ve ciddi enfeksiyon oluşturma potansiyelleri artar. Yapılan çeşitli çalışmalar sayesinde enterokoklara ait pek çok virulans faktörleri bulunmuştur (Jett ve ark. 1994, Fisher ve Phillips 2009). Enterokokların günümüze kadar araştırılıp bulunan virulans faktörleri:

- Enterokokal yüzey proteini
- Hemolizin/Sitolizin
- Jelatinaz
- Agregasyon faktörü
- Antibiyotik direnci
- AS-48
- Biyofilm tabakası
- *Enterococcus faecalis* antijen A Proteini (EfaA proteini)
- Hyaluronidaz
- Kapsül ve hücre duvarı polisakkaritleri
- Lipoteikoik asit
- Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Moleculer Adhesin of Collagen from *Enterococci* (MSCRMM Ace)
- Seks feromonları
- Süperoksitler

#### **2.4.1. Enterokokal Yüzey Proteini:**

*Esp* enterokoklarda sıklıkla gözlemlenen virulans faktörleri arasındadır. Yapılan çalışmalar *esp*'nin enterokoklarda diğer virulans faktörlerine göre daha çok bulunduğunu göstermektedir. *Esp* ilk defa *E.faecalis* MMH594 suşundan izole edilmiş olup *esp* geninde kodlanmaktadır ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu gen 153 kb büyüklüğündeki bir patojenite adasında yer alır ve konjugasyonla izolatlar arasında aktarılabilir. *Esp*, salgına sebep olan *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatlarında bulunduğu için marker olarak epidemik çalışmalarda kullanılabilirliği düşünülmektedir. *Esp*'ın gaita kökenli izolatlarda nadiren varlığına rastlanırken, bakteriyemi ve endokardite sebep olan suşlarda ise yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir (Yüksel 2012).

*Esp*, N-terminal ucu ile hücre duvarına bağlanıp, bakterinin immün cevaptan kaçmasını kolaylaştırır. Ayrıca üriner sistem enfeksiyonlarında kolonizasyon faktör gibi davranarak *E.faecalis*'in mesane epiteline yapışmasını sağlamaktadır. Bunların dışında biyofilm oluşumuna sebep olarak bakterinin bulunduğu zeminden çeşitli temizlik malzemeleriyle çıkarılmasına karşı dirençlilik sağlar ve yayılıma katkı sağlamış olur. Ek olarak *esp*, enterokokların bazı antibiyotiklere de direnç göstermelerini sağlamaktadır.

Yapılan çalışmalarda proteinin iç yapısında yineleyen birimlerden oluşan bir bölge bulunmuştur. Bu bölge moleküle uzayıp kısalma özelliği kazandırmaktadır. Bu özellik sayesinde molekülün farklı varyasyonlarının olduğu ve bakterinin immün sistemden kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. (Çaylan 2004, Mahalleh ve Göncüoğlu 2014).

#### **2.4.2. Hemolizin/Sitolizin:**

Hemolizin olarak da adlandırılan sitolizin, salgınlardan izole edilen *E.faecalis* suşlarında %60'a varan sıklıkta saptanabilen bir virulans faktörüdür. Sitotoksik bir protein olan sitolizin insan, tavşan ve at kanında litik etkiye sahiptir. Ayrıca Gram pozitif mikroorganizmalar, eritrositler, makrofajlar ve Polimorfonükleer lökosit (PMNL)'e karşı da litik aktivite gösterirler. Buna karşın toksinin gram negatif bakteriler ve koyun eritrositlerinde inaktif olduğu gösterilmiştir. Koyun eritrositlerine karşı inaktif olması klinik laboratuvarlarda tanısız açıdan faydalı bir özelliktir. Ayrıca bir bakteriyosin de olan sitolizinin tüm gram pozitif mikroorganizmalar için bakterisidal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda patojen olan enterokokların sitolizin üretme oranı patojen olmayan suşlara göre daha fazla olduğu da gösterilmiştir (Moellering 1992, Mahalleh ve Göncüoğlu 2014).

Sitolizin kodlayan gen bölgesi, bakteriyel kromozom veya plazmid üzerinde entegre olarak bulunabilmektedir. Sitolizin operonu *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, ve *cylI* olarak adlandırılmış olan sekiz gen içermektedir. Sitolizin üretiminin quorum-sensing denen bir mekanizma ile olduğu bildirilmiştir. Quorum sensing mekanizması sitolizinin yapısal subünitlerini kodlayan *CylLS* sekresyonunu sağlar. Böylece sitolizin ekspresyonu indüklenmiş olur. Sonrasında *CylLS* ribozomda sentezlenerek posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve ekstrasellüler ortama



salgılanarak aktive olur. *CylR1* ve *CylR2* ise iki ayrı regülatör genidir ve sitolizin yapısal genlerinin transkripsiyonunu baskırlar (Kayaoğlu ve Orstavrik 2004).

Enterokokal hastalıkların prognozuna ve enterokokların virulansına sitolizinlerin etkileri hala tam olarak anlaşılammıştır. Enfeksiyon ilişkili *E.faecalis* suşlarıyla ilgili yapılan bir çalışmada suşların %60'ının sitolizin ürettiği buna karşın gaita kökenli *E.faecalis* suşlarındaki araştırmada ise %17'sinin sitolizin ürettiği görülmüştür. Buna benzer bir diğerk çalışmada ise bakteriyemi, endokardit gibi enfeksiyon hastalıkları ve gaita kökenli suşlarda sitolizin üretimi araştırlmış ancak oransal olarak bir farklılık görülmemiştir. İlerleyen zamanlarda moleküler bazlı yapılan çalışmalarda ise *cyl* geninin suşlarda inaktif olarak bulunduğu ancak hastane gibi çeşitli çevresel ortamlara bağılı olarak aktive olabildiği bildirilmiştir (Kayaoğlu ve Orstavrik 2004, Devriese ve ark. 2006).

### **2.4.3. Jelatinaz:**

Enterokoklarda jelatinaz varlığı ilk kez 1964 yılında *E.faecalis* suşlarında gösterilmiştir. *E.faecalis* suşlarında bu gen stafilokoklardaki AGR (Accessory gen regulator locus) bölgesine benzer diziler içeren *fsr* bölgesi tarafından kodlanmaktadır. *E. faecalis* OG1RF suşunda kodlama lokusta bulunan *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC* gen bölgelerinden, *fsrC* bölgesinin alt kısımlarındaki *gelE* ve *sprE* gen bölgeleriyle olduğu gösterilmiştir. *gelE*'nin jelatinaz, *sprE*'nin serin proteaz virulans faktörlerini düzenlediği belirtilmiştir. Jelatinaz faktörü hakkında çok fazla detaylı çalışma yapılmamış olup, yapılan çalışmalarda da *E.faecalis* suşlarında jelatinaz üretiminin farklı olduğu ortaya konulmuştur. Bir çalışmada *E.faecalis* izolatlarının yaklaşık %45-68'inde jelatinaz üretiminden sorumlu olan *fsr* bölgesi mevcutken, bir başka çalışmada endokardit izolatlarının %100'ünde, gaita izolatlarının ise %53'ünde *fsr* bölgesi tespit edilmiştir (Mahalleh ve Göncüoğlu 2014).

Enterokoklar tarafından üretilen jelatinaz kazein, kollajen, fibrinojen, jelatin, hemoglobin ve insülini hidrolize edebilen Matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstra selüler çinko içeren bir üyesidir. Jelatinazın biyofilm oluşumuna ve konak dokuların yıkımına sebep olduğu gösterilmiştir. Jelatinaz üreten *E.faecalis* suşlarının jelatinaz üretmeyen suşlara göre akut toksik etkilerinin daha yüksek olduğu ve hayvan modellerinde endokardite sebep olduğu gösterilmiştir. Jelatinaz

inhibisyonunun doku kültürlerinde kemik yıkımını azalttığı da bir başka çalışmada tespit edilmiştir (Akçimen 2010, Yüksel 2012).

#### 2.4.4. Diğer Virulans Faktörleri

Agregasyon faktörü:

AF bakteri yüzeyinde bulunan, protein yapıda bir adhezin olup *asal* geni tarafından kodlanmaktadır. AF enterokoklar arasında plazmid transferini kolaylaştırır ve birçok özelliği ile bakterinin virulansına katkı sağlar. Bunlar hücre-hücre temasını düzenleme, hücre dışı matriks proteinlerin adezyonla konak hücreye yapışma, konjugasyon sırasında adezyonu artırma ve hücre yüzey hidrofobitesini artırma gibi özelliklerdir. Ayrıca nötrofil ve makrofajlara da bağlanabilirler. AF mevcut olan enterokoklar opsonizasyondan bağımsız olarak nötrofillere bağlanırlar ve nötrofiller tarafından bakterinin öldürülmesini engellerler. Makrofajlarla olan fagositozda ise reaktif oksijen türlerinin üretimi ile oluşan oksidatif patlamayı inhibe ederler. Bu şekilde fagositik yıkıma karşı direnç sağlanmış olur. AF, enterokoklara kalp kapaklarına bağlanma ve endokardit oluşturma yeteneği, böbrek epitel hücrelerine bağlanma ve üriner sistem infeksiyonu oluşturma yeteneğini sağlamaktadır. Bilhassa katater infeksiyonlarında, *E.faecalis* izolasyonu *E.faecium*'a göre daha fazladır. Bunun nedeni *E.faecalis* suşlarına katetere tutunma yeteneğini veren AF'dür (Tok 2006, Mahalleh ve Göncüoğlu 2014).

Antibiyotik direnci:

Enterokoklarda antibiyotiklere karşı intrensek ve ekstrensek olmak üzere iki tip direnç mekanizması vardır. İntrensek direnç kromozal dirençle ilişkilidir. Mikroorganizmaların tür veya cinsine özgüdür. Enterokoklar sefalosporinlere, Trimetoprim/Sulfametoksazol (TMP-SMX)'e, penisilinlere, linkozamidlere, polimiksinlere, monobaktamlara, aminoglikozidlere (düşük düzeyde) ve dalfopristin/kinopristine karşı kalıtsal olarak dirençlidir. Kazanılmış direnç gelişimi ise iki yolla meydana gelmektedir (Mahalleh ve Göncüoğlu 2014). Bunlar;

- DNA mutasyonları ve direnç genlerini içeren transpozon veya plazmidlerin kazanılması

- Antibiyotik tedavilerinde seçilen antibiyotiğin kontrolsüz kullanımı ve baskın antibiyotik kullanımına bağlı olarak yeni bir DNA segmentinin konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyon mekanizmalarıyla genoma transferidir

Nazokomiyal enfeksiyonlar hastanın aldığı antibiyotik tedavi sonrasında intestinal florasında bulunan duyarlı suşların ortadan kalkıp yerine kullandığı antibiyotiğe karşı dirençli ve sitolitik toksin oluşturma özelliğine sahip suşların yerleşmesi ile başlar. Bu suşların çevreye yayılması duyarlı olan hastalarda eksojen kökenli enfeksiyonların oluşumunu tetikler. Suşların sahip olduğu bu antibiyotik direnci onların intestinal florada çoğalmalarını sağlar. Jelatinaz ve sitolitik toksin gibi faktörler ise doku invazyonunu kolaylaştırırlar (Akçimen 2010).

AS-48:

İlk defa *E.faecalis* S-48 suşundan izole edilmiştir. Plazmidte kodlanır. Gram pozitif ve gram negatif birçok bakteriye karşı sitolitik aktivite gösteren bir bakteriyosindir. Hedef hücreye sitoplazmik membran potansiyelini bozarak etki ettiği düşünülmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

Biyofilm tabakası:

Enterokoklar tarafından oluşturulan biyofilm tabakaları insanlarda endokardit ve üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olurlar. Glikoz, demir ve CO<sub>2</sub>'in varlığı, osmolarite, pH ve sıcaklık gibi faktörler bakterilerin biyofilm oluşturmalarını tetikler. Karbonhidrat metabolizması (çeşitli gram pozitif bakterilerde özellikle *E.faecalis*'de) biyofilm üretimini düzenlemektedir. Glikoz konsantrasyonunun yüksek düzeyde olduğu durumlarda enterokokal yüzey proteini biyofilm oluşumunu arttırmaktadır (Mahalleh ve Göncüoğlu 2014).

EfaA proteini:

İlk olarak bir endokardit enfeksiyonunda *E.faecalis* suşundan izole edilmiştir. Bu protein *efaA* geninde kodlanır. Mikroorganizmanın metabolik faaliyetlerini devam ettirebilmesi ve çoğalması için mangana ihtiyaç vardır. EfaA proteini mangan bakımından yetersiz olan ortamlarda bakteri tarafından fazlaca eksprese edilir ve mangan transport sisteminde çözünen maddeyi bağlayan reseptör görevini görmektedir. Klinik izolatlar dışında et, süt ve peynir gibi gıdalardan izole edilen

*E.faecalis* suşlarında da EfaA bulunduğu gösterilmiştir (Akçimen 2010, Kayaoğlu ve Orstavik 2004).

#### Hyaluronidaz

Hyaluronidaz enzimi *hyl* geninde kodlanmaktadır. Jelatinaz ve serin proteaz gibi hidrolitik enzimler grubunda yer alan bu enzim hyaluronik asidi tahrip ederek doku hasarına yol açar. Bağ dokuda bulunan mukopolisakkaritleri depolimerize eder ve bakterinin vücut içinde yayılmasını sağlar. Hyaluronidaz kendi yaptığı zararlara ek olarak diğer bakteri toksinlerinin zararlı etkilerini indükler ve doku hasarının şiddetini artırır (Kayaoğlu ve Orstavik 2004, Fisher ve Phillips 2009).

#### Kapsül ve hücre duvarı polisakkaritleri:

Kapsül polisakkaridi klinik *E.faecalis* izolatlarında yaygın olarak izole edilen virulans faktörüdür ve suşta bu faktörü kodlayan bir operon bulunmaktadır. Bunun dışında ikinci bir kapsül polisakkaridi daha hem *E.faecalis* hem de *E.faecium* izolatlarında tanımlanmıştır. Bu iki polisakkaride karşı oluşan antikolar enterokokal enfeksiyonların önlenmesinde rol oynarlar. Enterokoklarda hücre duvarı polisakkaritleri fosfat, galaktoz, glikoz ve gliserol komponentlerinden oluşur. Antikoların hedef bölgesi olan bu yapı enterokokların virulansları dışında enfeksiyona karşı koruyucu immünitede de rol alırlar. Bu yüzden aşı oluşturma çalışmaları araştırılmaktadır (Upadhyaya ve ark 2009).

#### Lipoteikoik asit (LTA):

Hücre duvarı yapısında bulunan LTA enterokokların D grubu antijenini oluşturmaktadır ve poligliserol fosfat ve fosfodiesterlere bağlı, glikolipid içeren bir amfipatik moleküldür. Molekülün lipit parçası; trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi çok sayıda ökaryotik hücrelere bağlanabilmektedir. TNF ve interferon salınımını sağlayarak immun cevabın düzenlenmesini sağlarlar. LTA *E.faecalis* suşlarında adezyon özelliğine sahiptir ve verici hücre tarafından üretilen AF için alıcı hücrede reseptör olarak rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple plazmid transferine ve agregat oluşumunu kolaylaştırarak *E.faecalis*'in virulansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan bir başka çalışmada ise LTA'in enterokoklarda biyofilm oluşumuna ve antimikrobiyal peptidlere karşı direnç

geliştirmelerine sebep olduğu bildirilmiştir (Yüksel 2012, Mahalleh ve Göncüoğlu 2014).

MSCRMM Ace (Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Moleculer Adhesin of Collagen from *Enterococci*):

Yapısal ve fonksiyonel olarak *S.aureus*'un kollajen bağlayan proteini (Cna)'ya benzer niteliktedir. *E.faecalis*'lerde kollajen bağlayıcı protein olarak izole edilen Ace, enteokokal enfeksiyonlarda özellikle *E.faecalis* endokarditlerinde sıklıkla eksprese edilen bir virulans faktörüdür ve *ebpAfm*, *ebpBfm*, *ebpCfm*, *scm*, *fms* genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu faktör klinik izolatlarda fekal izolatlara göre daha yüksek oranda izole edilmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik 2004, Silianpa ve ark. 2009).

Seks feromonları:

Seks feromonları *E.faecalis*'lerde sinyal peptitleri olarak rol oynayan 7-8 amino asit uzunluğundaki hidrofobik peptitlerdir. Kromozom üzerinde bulunurlar. Enterokok suşları arasında konjugatif plazmidin aktarımı bu feromonlar aracılığıyla gerçekleştiği ve aktarımı birkaç kat daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Seks feromonları alıcı hücre tarafından salgılanır. Salgılanan bu feromon verici hücrede AF'nün üretimini tetikler. Böylelikle alıcı ve verici hücre arasında sıkı bir temas sağlanır ve plazmidin geçişi kolaylaşır. Plazmid dışında antibiyotik direnci ve sitolizin gibi diğer virulans faktörlerinin de transferi bu feromonlar aracılığıyla diğer suşlara yayılabilmektedir. Bazı seks feromonları nötrofiller için kemotaktiktir. Yani süperoksit üretimini ve lizozomal enzimin salgılanmasını uyarır ve bu sayede doku hasarının oluşumunu tetikler (Akçimen 2010, Yüksel 2012).

Süperoksitler:

*E.faecalis* suşlarının çoğu ve bazı *E.faecium* türleri tarafından sentezlenirler. Süperoksitlerin enterokoklar tarafından sentezlenip dış ortama salındığı ve bakterinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir. Enterokokal bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik suşlarda gaita kökenli izolatlara göre yüksek oranda süperoksit radikalinin üretilmiş olduğu gösterilerek bu süperoksit üretiminin virulansla ilişkili olabileceği fikri öne sürülmüştür (Devriese ve ark. 2006, Akçimen 2010).

## 2.5. Korunma ve Kontrol

Enterokokların sebep olduğu enfeksiyonların çoğu endojen kökenlidir ve barsaklardan translokasyonla sistemik bir enfeksiyona dönüşür. VRE enfeksiyonlarının yayılmasında özellikle barsak kanalı en kritik kaynaktır. VRE kolonizasyonu olan hastaların tedavisiyle ilgilenen sağlık çalışanlarının ellerinin kontamine olması hastalığın çevreye yayılma riskini yükseltir. Kontrolsüz antibiyotik kullanımı, hastanede uzun süre yatma, VRE kolonizasyonu olan diğer hastalarla temas, VRE izole edilmiş hastada kullanılan tıbbi aletlerin diğer hastalarda da dezenfeksiyon/sterilizasyonu yapılmadan kullanımı, bakterinin cansız ortamlarda uzun süre canlı kalabilme potansiyeli ve hastanede yaygın bulunması gibi nedenler de VRE salgınlarının başlıca nedenleri arasındadır (Guidelines for the Prevention and Control of VRE 1996). 1980'li yıllardan itibaren artan VRE enfeksiyonlarını önlemek amacıyla Centers for Disease Control (CDC)'e bağlı Hospital Infection Control Practice Advisory Committee (HICPAC) 1994 yılında bir kılavuz hazırlamıştır. Bu kılavuza göre dikkat edilmesi gereken noktalar (HICPAC 1995, Altaş 2002, Öztürk ve ark. 2008);

- Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı
- Hastanedeki personellerin konu hakkında bilgilendirilmesi
- Vankomisin kullanımının kısıtlanması
- Kontrol önlemlerinin alınması

Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı:

VRE'lerin yayılımının önlenmesinde mikrobiyoloji laboratuvarının rolü büyüktür. Çünkü kontrol çalışmaları mikrobiyoloji laboratuvarında elde edilen sonuçlara göre şekil almaktadır. Hızlı ve doğru tespitler doğru önlemlerin erken alınmasını sağlamaktadır. Çoğu hastanelerde ilk VRE suşları klinik örneklerden izole edilmiştir. Bu nedenle VRE'nin bir kez izole edildiği bir hastanede, enterokok üremiş olan tüm örneklerin antibiyotik duyarlılık testlerine tabi tutularak vankomisine duyarlılık açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. VRE izole edilmiş örnekler vankomisine duyarlılık açısından tekrar test edilmeli, ve ikinci sonucun çıkmasını beklemeden hastanın yattığı servisi bilgilendirmek gerekmektedir. Bu şekilde

hastanın erkenden izole edilmesi ve enfeksiyonun yayılımının engellenmesi sağlanmış olur (Öztürk ve ark. 2008).

Hastanedeki personellerin konu hakkında bilgilendirilmesi:

Doktorlar da dahil olmak üzere hasta bakımından sorumlu personeller, laboratuvar teknisyenleri, öğrencilere VRE'nin önemi, epidemiyolojisi, kontrol yöntemleri hakkında bilgi verilip eğitilmelidirler. Bu tarz eğitimler devamlı olarak belirli aralıklarla tekrarlanmalıdır (HICPAC 1995, Altaş 2002).

Vankomisin kullanımının kısıtlanması:

Dirençli mikroorganizmaların gelişmesinde antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı önemli faktörler arasındadır. 1980'li yıllarda vankomisin kullanımına dikkat edilmemesi sonucu VRE'ler oluşmuş ve ciddi VRE salgınlarının ortaya çıkmasına sebep olunmuştur. Vankomisin kullanımının kısıtlanmasıyla salgınların önemli ölçüde önleneceğini kanıtlayan çalışmalar vardır. Bu amaçla HICPAC kılavuzunda vankomisin kullanımının uygun olduğu ve olmadığı durumlar vurgulanmıştır (HICPAC 1995). Dolayısıyla her zaman HICPAC önerileri göz önünde bulundurulmalıdır. Fakat VRE vankomisin dışında daha birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu için, sadece vankomisin kısıtlanması salgınların oluşmasında etkili değildir. Vankomisine ek olarak antianaerobik etkinliği olan antibiyotiklerin ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin de kullanımının kısıtlanması gerekmektedir (Altaş 2002, Öztürk ve ark. 2008).

Kontrol önlemlerinin alınması:

Hastadan hastaya VRE bulaşı olmaması için alınması gereken izolasyon önlemleri (HICPAC 1995, Altaş 2002):

- VRE ile enfekte veya kolonize olan hastalar tek kişilik odalara veya diğer VRE pozitif olan hastalarla aynı odaya yerleştirilmelidir.
- VRE pozitif olan hasta odasına girerken temiz eldiven ve önlük giyilmeli, çıkarken de eldiven ve önlük çıkartılmalıdır. Eller eldiven çıkarıldıktan sonra

sabunla veya antiseptik ajanlarla yıkanmalı, hasta odasındaki yüzeylerle tekrar temas edilmemelidir.

- VRE pozitif hastalar için kullanılan steteskop, rektal termometre, tansiyon aleti gibi aletler diğer hastalar için kullanılmamalı, kullanılması gerekiyorsa de sterilizasyon veya dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra kullanılmalı, odalar arası eşya alışverişi yapılmamalıdır.
- VRE sorunu olan hastanelerde, ne sıklıkla kültür alınması gerektiği, yeni olgu saptandığında aynı serviste yatan diğer hastaların taranıp taranmaması, izolasyonun ne zaman sonlandırılacağı gibi konuların hastanenin enfeksiyon kontrol ekibi tarafından yazılı olarak belirlenmiş olması gerekmektedir.
- VRE kolonizasyonu uzun süre devam edebileceği için izolasyonun en az bir hafta aralıkla alınmış üç veya daha fazla negatif kültür sonucunda sonlandırılması önerilmektedir. Ayrıca, taburcu edilen VRE pozitif hastaların kayıtlarına uyarı eklenmesi, bu hastanın yeniden hastaneye yatırılması durumunda hemen izole edilmesini sağlamaktadır.
- Sağlık personellerinde VRE taşıyıcılığı ve yayılımı nadiren bildirilmiştir ancak VRE için tanımlanmış önemli bulaş mekanizmalarından biri değildir.

Tüm önlemler alınmasına rağmen hala VRE kontrol altına alınamıyorsa sağlık personelleri kronik cilt ve tırnak problemleri bakımından incelenmeli, VRE yayılımı ile epidemiyolojik olarak ilişkili olduğu belirlenen personelin VRE negatif hastalara bakım yapmasından kaçınılmalıdır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Araştırmanın Türü:

Bu tez çalışmasında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (ÇOMÜ-SUAM) Mikrobiyoloji Laboratuvarına 05.06.2013 – 28.03.2014 tarihleri arasında farklı kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen 200 *Enterococcus* izolatının önemli virulans faktörlerini kodlayan *gelE*, *esp*, ve *cylB* genlerine sahip olup olmadıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

##### 3.1.2. Bakteri İzolatları:

ÇOMÜ-SUAM Mikrobiyoloji Laboratuvarına 05.06.2013 – 28.03.2014 tarihleri arasında farklı kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen ve Vitek 2 otomatize sistemi (BioMerieux, Fransa) ile tanımlanan 200 *Enterococcus* izolatı ve 3 adet iyi standardize edilmiş suş ile çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteriler ve sayıları Tablo 4’te verilmiştir.

**Tablo 4:** Çalışmada kullanılan toplam bakteri izolatları

|  |    |
|--|----|
| <i>E.faecalis</i>                                | 90 |
| <i>E.faecium</i>                                 | 36 |
| <i>E.gallinarum</i>                              | 5  |
| <i>VRE faecium</i>                               | 66 |
| <i>VRE faecalis</i>                              | 1  |
| <i>E.avium</i>                                   | 2  |
| <i>gelE</i> bulunduran <i>Enterococcus</i> suşu* | 1  |
| <i>esp</i> bulunduran <i>Enterococcus</i> suşu*  | 1  |
| <i>cylB</i> bulunduran <i>Enterococcus</i> suşu* | 1  |

\* Gözalan ve ark. (2015) tarafından tanımlanan izolatlar.

### 3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar:

- Koyun kanlı agar (RTA, Sheep Blood agar 02002, Türkiye)
- Bile-esculin agar (HIMEDIA, Lot: 0000195007, Hindistan)
- Brain heart infussion (BHI, Salubris, Türkiye)
- DNA izolasyon kiti (Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit; Lot: 1669675, ABD)
- HCl (Merck, 1.00317.2501, Türkiye)
- Lizozim (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Tris (Merck, Almanya)
- EDTA (Merck, Almanya)
- TritonX (Thermo Fisher Scientific, ABD)
- Tris Buffer EDTA (TBE, Gibco UltraPure; Lot: 1665533, İngiltere)
- dATP (Invitrogen, Lot: 1628357, ABD)
- dCTP (Invitrogen, Lot: 1628355, ABD)
- dGTP (Invitrogen, Lot: 1628356, ABD)
- dTTP (Invitrogen, Lot: 1628352, ABD)
- PCR buffer (10×; Invitrogen Lot: BP5B1a, ABD)
- MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Lot: BM3B1d, ABD)
- Taq DNA polimeraz (Invitrogen Lot: BK2B1c, ABD)
- Agaroz (Invitrogen, Lot: 442893, ABD)
- DNA marker (100 bp DNA ladder, Invitrogen, Lot: 939786, ABD)
- Etidyum bromür (Sigma, Lot: 0801, Almanya)
- Nükleotid primerler (Tablo 5) (IDT, Lots: 196064053, 196064054, 196064055, 196064056, 196064057, 196064058, ABD)

**Tablo 5.** Çalışmada kullanılan primerlerin dizilimleri

| Gen Bölgesi | Primer Adı  | Nükleotid dizisi (5'-3') | Hedef fragman büyüklüğü (bç) |
|-------------|-------------|--------------------------|------------------------------|
| <i>Esp</i>  | <i>TE34</i> | TTGCTAATGCTAGTCCACGACC   | 933                          |
|             | <i>TE36</i> | GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA  |                              |
| <i>cylB</i> | <i>TE15</i> | ATTCCTACCTATGTTCTGTTA    | 843                          |
|             | <i>TE16</i> | AATAAACTCTTCTTTTCCAC     |                              |
| <i>gelE</i> | <i>TE9</i>  | ACCCCGTATCATTGGTTT       | 419                          |
|             | <i>TE10</i> | ACGCATTGCTTTTCCATC       |                              |

bç: baz çifti

#### 3.1.4. Kullanılan Gereçler:

- Biyogüvenlik kabinleri (TEZ-SAN Class II ve ESCO Class II, Türkiye)
- Etüv (Memmert, Fransa)
- Buzdolabı ve Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye ve Bosch, Almanya)
- Santrifüj cihazı (Eppendorf centrifuge 5424, Almanya)
- Vorteks cihazları (Heidolph REAX ve XH-IIAqitador, Almanya)
- Karıştırıcılar (Biosan Combi-Spin, Litvanya ve Hot Stirrer MS300HS, Kore)
- Blok ısıtıcı (Biosan TDB 100 Dry Block, Letonya)
- Hassas terazi (DENSU UFO plus mode JW, Kore)
- pH metre (HANNA instruments HI 2211, Romanya)
- PCR cihazı (2720 Thermal Cycler/Applied biosystems, Singapur)
- Agaroz jel elektroforez cihazı (Wealtec Elite 300 plus, Amerika)
- Görüntüleme cihazı (Quantum Vilber Lourmat, Fransa)

### 3.2. Yöntem

ÇOMÜ-SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 05.06.2013 – 28.03.2014 tarihleri arasında farklı kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilmiş ve Vitek 2 otomatize sistemi (BioMerieux, Fransa) ile tanımlanmış ve antibiyogramları yapılmış *Enterococcus* izolatlarının raporları gerekli birimlere bildirildikten sonra özel saklama sıvı besiyerlerine (gliserollü buyyon) alınıp  $-80^{\circ}\text{C}$  dondurucuda saklanmıştır. Bu çalışma retrospektif bir çalışma olduğundan dolayı  $-80^{\circ}\text{C}$  dondurucudan çıkarılan sıvı besiyerlerinden önce bakteriyi yeniden canlandırıp üretmek amacıyla koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıldı.

Saklama besiyerlerinden kanlı agarlara yapılan ekimler etüvde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saatlik bir inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrası petride oluşan alfa, beta ve gama hemolitik kolonilerinden öze dolusu alınıp lam üzerine %3'lük  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ten birkaç damla damlatılarak katalaz testi yapıldı. Katalaz testi negatif olan kolonilerin kanlı agar besiyerlerinden BEA'a pasaj alındı. BEA çalışma öncesi üretici firmanın talimatlarına uyarak 64,5g bile-esculin toz besiyeri 1000ml'lik distile suda kaynatılarak çözdürüldü. Ardından otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'ta 15 dakika sterilizasyona tabi tutuldu. Sterilizasyon sonrası besiyeri petri kaplarına agarın kalınlığı 4mm olacak şekilde döküldü. Ekimleri yapılan BEA'lar etüvde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün safra içeren BEA besiyerinde üreme meydana gelmesi gözlemlendi. Safralı ortamda eskulinin hidrolizi sonucu enterokokların oluşturduğu tipik özelliklerden olan besiyerlerinin renginin siyaha dönüşümü araştırıldı. Enterokok olarak teyit amacıyla son olarak da %6,5 NaCl içeren BHI besiyerine 2-3 koloni alınarak ekim yapıldı ve üreme durumu değerlendirildi. Buyyonda oluşan bulanıklık pozitif olarak değerlendirildi ve enterokok olduğu teyit edilerek çalışmaya dahil edildi.

Enterokok oldukları teyit edilmiş olan kolonilerin bulunduğu koyun kanlı agar besiyerleri DNA izolasyon aşamasına kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'ta saklandı.

### 3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu hazır kit (Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit, ABD) kullanılarak yapıldı. DNA izolasyonuna başlamadan önce izolasyon aşamasında kullanılacak olan Lysis buffer solüsyonu çalışma boyunca kullanılabilmesi için 50 ml olmak üzere stok olarak hazırlandı.

Lysis buffer solüsyonu içeriği;

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Lizozim (50mg/ml) | 1g    |
| Tris (0,5M)       | 2,5ml |
| EDTA (0,2M)       | 625ml |
| TritonX (% 1)     | 5ml   |

DNA izolasyonu için 900µl SF içeren ependorf tüplerine koyun kanlı agar besiyerinden öze dolusu koloni alınarak içinde süspanse edildi. Ardından maksimum devirde (21 130 rcf) 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan ependorf tüpünden pelete değmeden üst sıvı mikropipetle alındı ve atıldı. Üzerine 180µl lysis buffer eklendi, süspanse edildi ve vortekslendi. 37°C'da blok ısıtıcıda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında 20µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi. Üzerine 200µl genomic lysis/binding buffer eklendi ve yine vortekslendi. Ardından bu sefer blok ısıtıcıda 55°C'da 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında 200µl %96'lık etanol eklendi ve homojenize bir çözelti elde edebilmek için 5 saniye boyunca vortekslendi. Ependorf tüpündeki lizat spin kolona mikropipetle boşaltıldı. 18 000 rcf devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra eski toplama tüpü atıldı yerine yeni toplama tüpü konuldu. Spin kolona etanol ile hazırlanmış Wash buffer 1'den 500µl eklendi. 18 000 rcf devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında yine eski toplama tüpü atıldı yerine yeni toplama tüpü konuldu. Kolona bu sefer etanol ile hazırlanmış Wash buffer 2'den eklendi. Maximum devirde 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Yine santrifüj sonrası eski toplama tüpü atıldı, spin kolon steril ependorf tüpüne yerleştirildi. Kolona 200µl elüsyon buffer eklendi ve 1 dakika oda ısısında bekletildi. Oda ısısında bekleme süresi tamamlanınca 1 dakika maksimum devirde (21 130 rcf) santrifüj edildi.

Santrifüj sonrasında spin kolon atıldı, ependorf içindeki lizatla birlikte buzdolabında -20°C'ta PCR aşamasına kadar saklandı.

### 3.2.2. PCR Reaksiyon Karışımı Hazırlanması:

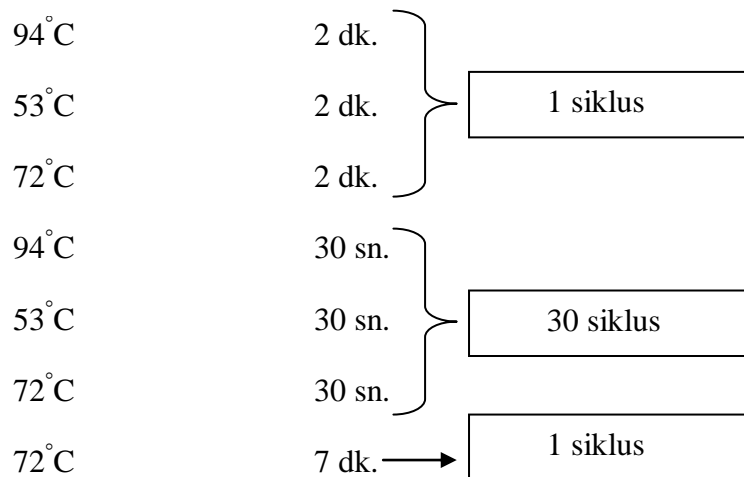
PCR karışımı aşağıdaki içeriklerle hazırlandı;

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| PCR buffer (10×)          | 3µl     |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM)  | 0,9µl   |
| dNTP (10mM)               | 0,6µl   |
| primer-F (20pmoles/µl)    | 0,6µl   |
| primer-R (20pmoles/µl)    | 0,6µl   |
| Taq DNA polimeraz (5U/µl) | 0,12µl  |
| ddH <sub>2</sub> O        | 21,78µl |

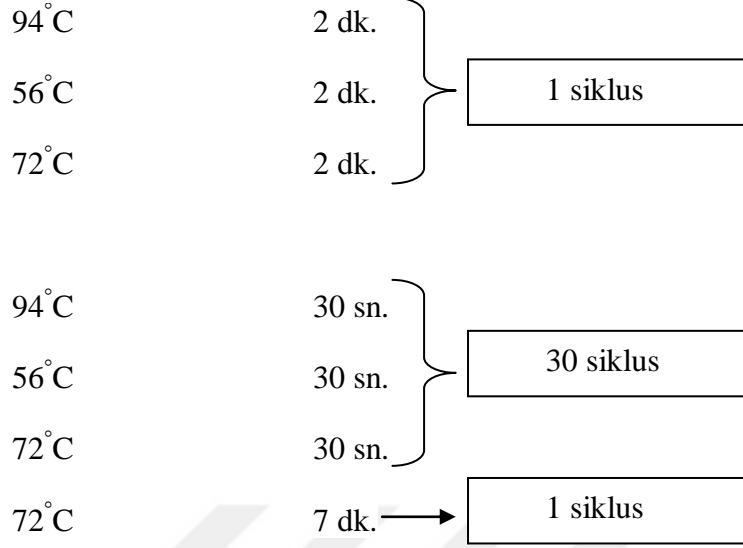
26µl hazırlanan master miks'ten 4µl de DNA izolasyonu yapılmış olan şablon DNA'dan PCR tüpüne eklendi ve tüp önceden araştırılacak virulans genine ait primerlere göre sıcaklık ve siklusları ayarlanmış PCR cihazına yerleştirildi.

Virulans genlerine göre PCR siklus ve sıcaklıkları aşağıda belirtildiği gibi ayarlandı:

*gelE* primerleri için:



*esp* ve *cylB* primerleri için:



### 3.2.3. Agaroz Jel Elektroforez

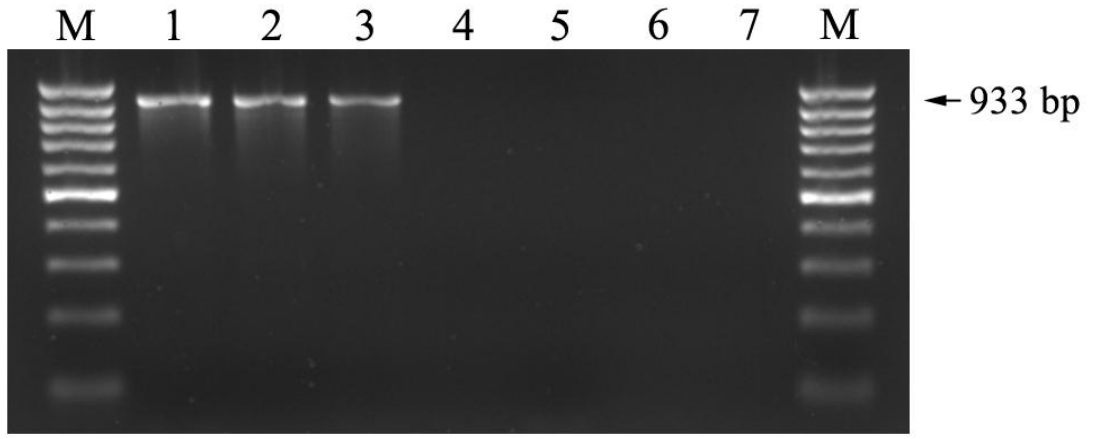
TBE içinde %1,5'lik agaroz hazırlandı ve 2µl Etidyum bromür (10mg/ml) eklenerek jelin katılaşması için oda ısısında 30-40 dk. bekletildi. 4µl PCR ürünleri DNA yükleme tamponu ile uygun oranda karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Marker için ise, 1µl DNA marker (100bp) tamponu uygun miktarda loading DNA tamponu ile karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. Jel 110V, 110mA'de 60 dk. yürütüldü.

### 3.2.4. Jelin Görüntülenmesi

UV illuminasyonu ve görüntüleme sistemi ile (Vilber Lourmat, Quantum ST4, Belçika) jel görüntülendi ve dökümente edildi. Beklenen baz çiftine ait DNA fragman bantları değerlendirildi (*gelE* geni için 419 bç, *esp* için 933 bç ve *cylB* için de 843 bç).

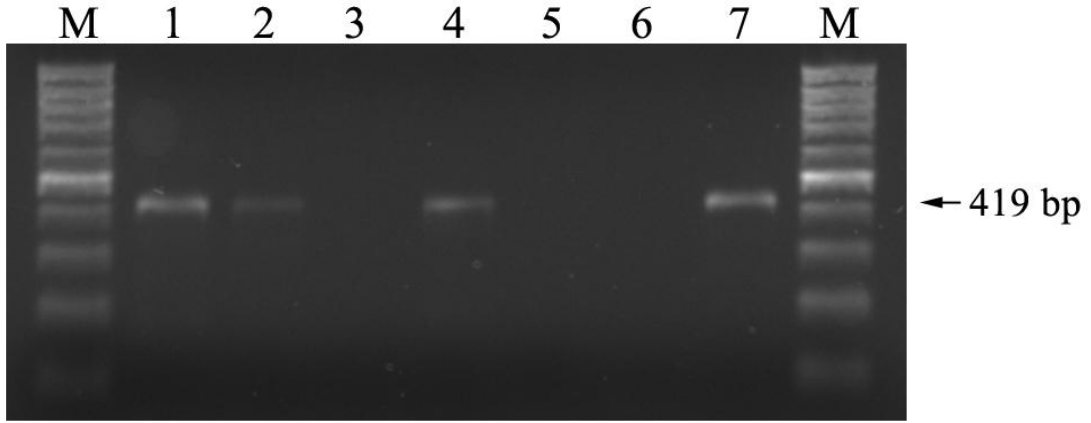
#### 4. BULGULAR

Enterokok suşunun üç önemli virulans faktörü geninden *esp* geni amplifiye olan ve dolayısıyla bu genin varlığı belirlenen toplam 167 izolat ortaya kondu. Bu değerlendirmeye esas olan PCR analizi ile ilgili temsili agaroz jel görüntüsü Resim 1'de gösterildi. Ayrıca, toplam 52 izolatın *gelE* ve 33 izolatın *cytB* genine sahip olduğu belirlendi ve bu sonuçlara ilişkin temsili agaroz jel resimleri sırasıyla Resim 2 ve 3'te gösterildi.

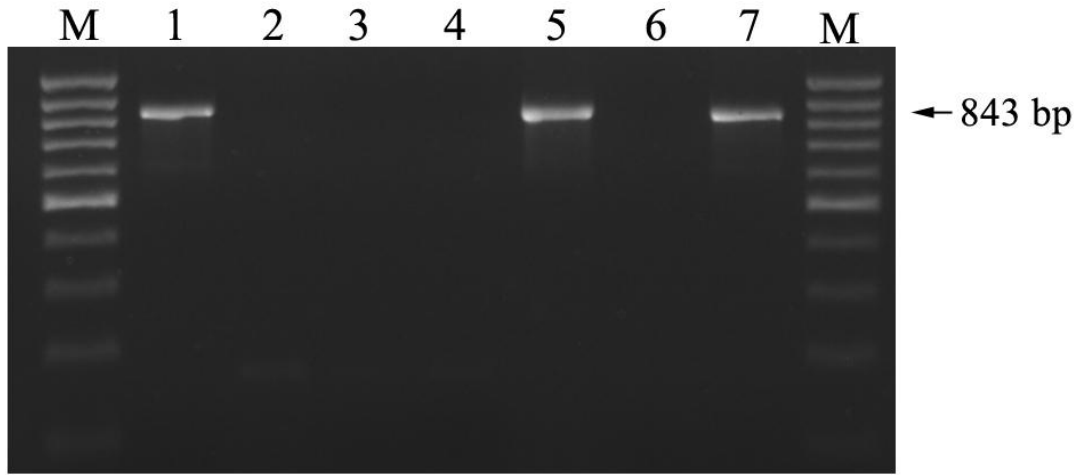


**Resim 1.** *esp* geni PCR amplifikasyonu (933 bç) elektroforez görüntüsü. Şerit M; 100 bç'lik DNA markır (Invitrogen, ABD), Şerit 1; *esp*+ kontrol, Şerit 2,3; *esp*+, Şerit 4-7; *esp*-





**Resim 2.** *gelE* geni PCR amplifikasyonu (419 bç) elektroforez görüntüsü. Şerit M; 100 bç'lik DNA markır (Invitrogen, ABD), Şerit 1; *gelE*+ kontrol, Şerit 2,4,7; *gelE*+, Şerit 3,5,6; *gelE*-



**Resim 3.** *cylB* geni PCR amplifikasyonu (843 bç) elektroforez görüntüsü. Şerit M; 100 bç'lik DNA markır (Invitrogen, ABD), Şerit 1; *cylB*+ kontrol, Şerit 2,3,4,6; *cylB*-, Şerit 5,7; *cylB*+

Araştırılan üç farklı genin ilgili izolatlardaki mevcudiyeti ile pozitif ve negatif sonuçlar değerlendirildiğinde yedi farklı grup varyasyonunun ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu gruplar aşağıdaki şekilde sınıflandırıldı;

*esp+*, *gelE+*, *cylB+*

*esp+*, *gelE+*, *cylB-*

*esp+*, *gelE-*, *cylB+*

*esp+*, *gelE-*, *cylB-*

*esp-*, *gelE+*, *cylB-*

*esp-*, *gelE-*, *cylB+*

*esp-*, *gelE+*, *cylB+*

*esp-*, *gelE-*, *cylB-*

Araştırılan 200 Enterokok izolatının üç önemli virulans faktörü geninin spesifik bölgelerinin amplifiye edilmesinin ardından suşların bu genleri hangi kombinasyonla içerdikleri Tablo 6’da gösterildi.

**Tablo 6.** *Esp*, *gelE* ve *cylB* genlerinin pozitiflik oranı ve izolatlara göre dağılımı.

|                     | <i>esp+</i>  | <i>esp+</i>  | <i>esp+</i>  | <i>esp+</i>  | <i>esp-</i>  | <i>esp-</i>  | <i>esp -</i> | <i>esp-</i>  |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                     | <i>gelE+</i> | <i>gelE+</i> | <i>gelE-</i> | <i>gelE-</i> | <i>gelE+</i> | <i>gelE-</i> | <i>gelE+</i> | <i>gelE-</i> |
|                     | <i>cylB+</i> | <i>cylB-</i> | <i>cylB+</i> | <i>cylB-</i> | <i>cylB-</i> | <i>cylB+</i> | <i>cylB+</i> | <i>cylB-</i> |
| <i>VRE faecium</i>  | -            | 7            | 2            | 56           | -            | -            | -            | 1            |
| <i>VRE faecalis</i> | -            | -            | -            | 1            | -            | -            | -            | -            |
| <i>E.faecium</i>    | -            | 5            | 1            | 24           | -            | 1            | -            | 5            |
| <i>E.faecalis</i>   | 11           | 16           | 13           | 29           | 9            | 4            | 1            | 7            |
| <i>E.avium</i>      | -            | -            | -            | 1            | -            | -            | -            | 1            |
| <i>E.gallinarum</i> | -            | -            | -            | 2            | 2            | -            | -            | 1            |
| <b>Toplam</b>       | <b>11</b>    | <b>28</b>    | <b>16</b>    | <b>113</b>   | <b>11</b>    | <b>5</b>     | <b>1</b>     | <b>15</b>    |
| <b>%</b>            | <b>5,5</b>   | <b>14</b>    | <b>4</b>     | <b>56,5</b>  | <b>5,5</b>   | <b>2,5</b>   | <b>0,5</b>   | <b>7,5</b>   |

Bu sonuçlara göre her üç geni (*esp*, *gelE*, *cylB*) de ihtiva eden izolat sayısı 11 (%5,5) olarak bulundu. Diğer taraftan *esp*+, *gelE*+, *cylB*- sayısı 28 (%14), *esp*+, *gelE*-, *cylB*+ sayısı 16 (%4), *esp*+, *gelE* -, *cylB*- sayısı 113 (%56,5), *esp*-, *gelE*+, *cylB*- sayısı 11 (%5,5), *esp*-, *gelE*-, *cylB*+ sayısı 5 (%2,5), *esp*-, *gelE*+, *cylB*+ sayısı 1 (%0,5) ve *esp*-, *gelE*-, *cylB*- sayısı 15 (%7,5) olarak tespit edildi.

Bu çalışma kapsamında analiz edilen toplam 200 izolatın tür adı ve direnç durumu bakımından 90 adedi *E.faecalis* (%45), 36'sı *E.faecium* (%18), 1'i *VRE faecalis* (%0,5), 66'sı *VRE faecium* (%33), 5'i *E.gallinarum* (%2,5) ve 2'si *E.avium* (%1) olarak suşların izole edildiği numunelerin özellikleri araştırıldığında izolatların 162'si (%81) klinik veya servislerden gelen örnekler ve 38'i (%19) de sürveyans örnekleri olarak ayrıldı (Tablo 7). Klinik/servislerden gelen örneklerin materyal dağılımı şu şekilde tespit edildi: 89'u idrar (%44,5), 10'u apse (%5), 31'i yara (%15,5), 5'i doku (%2,5), 18'i kan (%9), 2'si ETA (%1), 1'i balgam (0,5), 2'si IV Kateter (%1), 1'i Trakeal kateter (0,5), 1'i BOS (0,5) ve 2'si diren (%1). Ayrıca 200 enterokok izolatınının 67'si *VRE* (%33,5), 133'ü (%66,5) de vankomisin duyarlı enterokok (*VSE*) olarak bulundu.

**Tablo 7.** Enterokok suşlarının izole edildiği materyale göre dağılımı.

|                    | <i>E.faecalis</i> | <i>E.faecium</i> | VRE<br><i>faecalis</i> | VRE<br><i>faecium</i> | <i>E.gallinarum</i> | <i>E.avium</i> |
|--------------------|-------------------|------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|----------------|
| İdrar              | 52                | 18               | -                      | 15                    | 3                   | 1              |
| Yara               | 22                | 4                | -                      | 4                     | -                   | 1              |
| Kan                | 8                 | 7                | -                      | 3                     | -                   | -              |
| Apse               | 4                 | 2                | -                      | 4                     | -                   | -              |
| Doku               | 1                 | 2                | 1                      | 1                     | -                   | -              |
| ETA                | 2                 | -                | -                      | -                     | -                   | -              |
| Balgam             | 1                 | -                | -                      | -                     | -                   | -              |
| IV Kateter         | -                 | 1                | -                      | -                     | -                   | -              |
| Trakeal<br>kateter | -                 | 1                | -                      | 1                     | -                   | -              |
| Sürveyans          | -                 | 1                | -                      | 35                    | 2                   | -              |
| BOS                | -                 | -                | -                      | 1                     | -                   | -              |
| Diren              | -                 | -                | -                      | 2                     | -                   | -              |
| <b>Toplam</b>      | <b>90</b>         | <b>36</b>        | <b>1</b>               | <b>66</b>             | <b>5</b>            | <b>2</b>       |
| <b>%</b>           | <b>45</b>         | <b>18</b>        | <b>0,5</b>             | <b>33</b>             | <b>2,5</b>          | <b>1</b>       |

**Tablo 8.** Enterokok suşlarının izole edildiği materyale ve pozitif virulans geni kombinasyonuna göre dağılımı.

|               | <i>esp+</i>  | <i>esp+</i>  | <i>esp+</i>  | <i>esp-</i>  | <i>esp+</i>  | <i>esp-</i>  | <i>esp-</i>  | <i>esp-</i>  | <b>Toplam</b> |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
|               | <i>gelE+</i> | <i>gelE+</i> | <i>gelE-</i> | <i>gelE+</i> | <i>gelE-</i> | <i>gelE+</i> | <i>gelE-</i> | <i>gelE-</i> |               |
|               | <i>cylB+</i> | <i>cylB-</i> | <i>cylB+</i> | <i>cylB+</i> | <i>cylB-</i> | <i>cylB-</i> | <i>cylB+</i> | <i>cylB-</i> |               |
| İdrar         | 8            | 12           | 10           | -            | 44           | 7            | 2            | 6            | <b>89</b>     |
| Yara          | 1            | 7            | 2            | -            | 13           | -            | 2            | 6            | <b>31</b>     |
| Kan           | 1            | 4            | 2            | -            | 8            | 2            | -            | 1            | <b>18</b>     |
| Apse          | 1            | -            | -            | -            | 8            | -            | 1            | -            | <b>10</b>     |
| Doku          | -            | 2            | -            | -            | 3            | -            | -            | -            | <b>5</b>      |
| Diğer*        | -            | -            | -            | 1            | 6            | 1            | -            | 1            | <b>9</b>      |
| Sürveyans     | -            | 2            | -            | -            | 34           | 1            | -            | 1            | <b>38</b>     |
| <b>Toplam</b> | <b>11</b>    | <b>27</b>    | <b>14</b>    | <b>1</b>     | <b>116</b>   | <b>11</b>    | <b>5</b>     | <b>15</b>    |               |

\*Diren (n=2), ETA (n=2), Trakeal kateter (n=2), Balgam (n=1), IV Kateter (n=1), BOS (n=1)

Çalışma sonuçları enterokok suşlarının izole edildiği materyale ve pozitif virulans geni kombinasyonuna göre dağılımı dikkate alındığında en önemli numune olarak idrar (n=89) dikkati çekmektedir (Tablo 8). İdrar materyalinden sonra ikinci sıklıkta virulans faktörü izole edilen materyaller toplamda 38 pozitiflikle yapılan sürveyans çalışmaları olduğu tespit edildi. Bunları takiben yara, kan ve apse örnekleri üçüncü sıklıkta geri kalan örneklerde ise nadir de olsa pozitiflik saptandığı görüldü.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enterokokların virulans faktörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı virulans belirleyicileri araştırılmıştır. Dünyada ve Türkiye’de enterokokların virulans faktörleri ile ilgili yapılan çalışmalarda seçilen gen hedefleri ve araştırılan izolatlarda bu genlerin pozitiflik oranları arasında büyük varyasyon bulunmaktadır. Sedgley ve ark. (2005) 33 enterokok üzerine yaptıkları çalışmada *esp* gen pozitiflik oranını %60,6 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, *gelE* geni *E.faecalis* izolatlarının tamamında (%100) bulunurken *E.faecium* izolatlarında *gelE* genine rastlamamıştır. Dahlen ve ark. (2011) *esp* gen pozitiflik oranını %93, *gelE* gen pozitiflik oranını %10 ve *cylA* /*cylB* oranını ise 16,7 olarak bildirmişlerdir. Brezilya’da yapılan bir çalışmada (Comerlato ve ark. 2013) *esp* ve *gelE* oranları sırasıyla %76 ve %60 olarak bildirilmekle beraber Strateva ve arkadaşlarının (2016) çalışmasında bu oranlar *esp* için % 44,3, *gelE* için %64,3 ve *cylA* /*cylB* için %47,1 olarak belirlenmiştir. İran’da 201 klinik izolatın dâhil edildiği bir çalışmada (Kafil ve ark. 2013) *esp*, *cyl*, *gel* genlerinin de içinde bulunduğu çok sayıda virulans faktörleri incelenmiştir. Araştırmada bir *E.faecalis* izolatında ve *E.faecium*’ların %38,8’inde *cyl* geni bulmuşlardır. Diğer taraftan tüm *E.faecium* izolatları *efaA* ve *cyl* genini aynı anda içeriyorken, *cyl* ve *esp* pozitif olan *E.faecium* izolatlarının oranını %69,7 olarak saptamışlardır.

Ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalara bakıldığında Gözalan ve ark. (2015) 55 vankomisine dirençli *E.faecium* izolatında virulans genlerini multipleks PCR ile analiz etmişlerdir. Bu çalışmada *esp* pozitifliğinin %41 oranla invaziv, %96,7 oranıyla ise non-invaziv izolatlarda bulunduğunu tespit etmişler ve sadece bir izolatta ise *gelE* ile beraber birden fazla virulans genine rastlamışlardır. Vankomisin dirençli enterokoklar üzerine yapılan bir çalışma (Çakırlar ve ark. 2014), *esp* pozitiflik oranını %87 ve *cylB* oranını ise %4 olarak bildirmiştir. Adana’da gıda ve insan örneklerinden izole edilen enterokoklarda yapılan çalışmada (Terkuran ve ark. 2014) beş farklı virulans faktörü geni araştırılmış ve bunlar arasında *esp*, *gelE* ve *cylA* genleri pozitiflik oranı %8.3 ile %83.3 arasında değişkenlik göstermiştir. Baylan ve

ark. (2011), *esp* geni pozitifliği *E.faecalis* ve *E.faecium* suşlarında sırasıyla %35,6 ve %6,5 olarak tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada tür, dirençlilik ve izole edilen materyal farkı gözetmeksizin 200 izolatanın % 84'ünde *esp*, %25,5'inde *gelE* ve %16,5'da ise *cyLB* geni belirlenmiştir. Bu oranlar önceki bildirimlere göre oldukça yüksek olup çalışılan izolatların büyük bir bölümünün önemli virulans faktörlerine sahip olabileceğini göstermektedir. Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmalardaki enterokokların virulans faktörü genlerinin belirlenme oranlarındaki değişkenlik çalışmanın yapıldığı coğrafi lokasyona ve araştırma birimine göre farklılık göstermektedir. Mevcut çalışma sonuçları ve önceki bildirimler değerlendirildiğinde bu büyük varyasyonun nedeninin bakterinin izole edildiği materyalin kaynağı (klinik, fekal veya sürveyans), izole edildiği birimdeki popülasyon dinamiği, örneğin alındığı hastalardaki bireysel durumu (ilaç kullanımı, beslenme özelliği) ve dış çevredeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

*Esp* bakterinin adhezyonunu, kolonizasyonunu ve savunma sisteminden kaçışını sağlayan ve biyofilm ve persiste enfeksiyon oluşumuna katkı sunan önemli bir virulans faktörüdür. Enterokoklarda virulans faktörleri genleri üzerine yapılan çalışmalarda ise *esp*'nin en yaygın gözlemlenen virulans geni olduğu ortaya konulmuş ve bu oranın %6'dan %100'e kadar varyasyon gösterdiği saptanmıştır (Comerlato ve ark. 2013, Baylan ve ark. 2014, Çakırlar ve ark. 2014, Terkuran ve ark. 2014, Gözalan ve ark. 2015, Çopur ve ark. 2016). Mevcut çalışmada da benzer şekilde *esp* tüm suşların 167'sinde (%83,5) belirlenen en yaygın virulans geni olarak ortaya çıktı. Bununla beraber izolatların %58'inde *esp* tekli pozitif iken *esp* ile beraber çoklu virulansa sahip olanların oranı ise %26,5 olarak ortaya konuldu. Bu yüksek oranlar araştırma kapsamındaki etkenlerin önemli virulans belirleyicisi *esp*'ye sahip olabileceklerini göstermektedir. Önceki bildirimlerdeki ve mevcut çalışmadaki değişken pozitiflik oranlarının ise izole edilen materyallerin farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Enterokoklarda jelatin; kazein, kollajen, fibrinojen, hemoglobin ve insülini hidrolize edebilen ve biyofilm oluşumuna katkı sunabilen önemli bir virulans belirleyicisidir. Jelatinaz üretiminin bakteriler arasında değişken olduğu ve bu enzimi

kodlayan genin %7,9 ile %71 arasında farklılık gösteren oranda yaygın olduğu bildirilmiştir (Sabia ve ark. 2008, Comerlato ve ark. 2013, Gözalan ve ark. 2014, Çopur ve ark. 2016). Mevcut çalışmada *gelE* tüm suşların 51'inde (%25,5) belirlenmiş olup bu oran önceki bildirimlerle uyumlu bulunmuştur. Tüm izolatların %5,5'unda *gelE* tekli pozitif bulunurken her beş izolattan birinde *gelE* ile beraber başka bir virulans faktörü geni de pozitif bulunmuştur. Bu yüksek oranlar çalışma kapsamında değerlendirilen hem klinik hem de sürveyans izolatlarının önemli bir belirleyicisi jelatinaz aktivitesine sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmada *gelE* geninin varlığı *E.faecalis* izolatlarının 37'sinde ve *E.faecium* izolatlarının beşinde bulunmuş ve bu sonuçlar önceki çalışmaların aksine (Sedgley ve ark. 2005, Vankerckhoven ve ark. 2008) *gelE* varlığının sadece *E.faecalis* izolatlarında değil *E.faecium* izolatlarında da olabileceğini göstermektedir.

Virulansına nasıl etki ettiği tam olarak bilinmeyen sitolizinler veya bunları kodlayan genler enterokoklarda %4-60 oranında bulunmaktadır. Bu faktörlerin enfeksiyon ilişkili ve patojen suşlarda daha yüksek oranda belirlendiği gibi bazı enfeksiyonlardan izole edilen suşlarda ve gaita kökenli suşlarda sitolizin üretimi açısından önemli bir fark olmadığı da bildirilmiştir (Moellering 1992, Kayaoğlu ve Orstavrik 2004, Devriese ve ark. 2006, Çakırlar ve ark. 2014, Mahalleh ve Göncüoğlu 2014, Terkuran ve ark. 2014, Çopur ve ark. 2016). Mevcut çalışmada sitolizin üretiminden sorumlu gen grubu içinde *cylB* geni araştırılmış ve 33 izolatta (%16,5) amplifiye edilmiştir. Moleküler temelli çalışmalara dayanarak *cyl* geninin suşlarda inaktif olarak bulunduğu ancak hastane gibi çeşitli çevresel ortamlara bağlı olarak aktive olabildiği bilindiği için bu çalışmada ve literatürde bildirilen çalışmalardaki oranların değişken olmasının nedeninin etkenlerin karşı karşıya kaldıkları çevresel faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Vankomisin veya diğer antibiyotiklere direnç ile virulans genleri arasında hem pozitif hem de negatif ilişkinin olduğu bildiriler bulunmaktadır. Comerlato ve ark. (2013) vankomisin direnciyle virulans faktörleri arasında bir ilişki olmadığını ifade etmelerine rağmen Terkuran ve ark. (2014) böyle bir ilişkinin mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Çopur ve ark.'nın (2016) VRE ve VSE izolatlarında yaptıkları çalışmada *esp* ve *cyl* genlerinin aynı anda buldukları izolatların yüksek düzey VR *E.faecium* olduğu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan *gelE* geni ise yüksek düzey VS



*E.faecalis*'lerde bulunmuştur. Bu çalışmada vankomisin dirençli *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarında tekli virulans faktörü pozitifliği %85 gözlemlenmişken çoklu virulans faktörü pozitifliği %13,43 olarak belirlenmiştir. Bu oranlara vankomisine doğal dirençli olan *E.gallinarum* izolatları da eklendiğinde tekli virulans faktörü pozitifliği %84,7 ve çoklu virulans faktörü pozitifliği ise %12,5 olarak ortaya çıkmaktadır. Vankomisin duyarlı *E.faecium* ve *E.faecalis* suşlarında ise bu oranlar sırası ile %69,4 ve %46,6 olarak ortaya konmuştur. Bu sonuçlar da popülasyon dinamiği ve etkenle ilgili diğer faktörlere bağlı olarak antibiyotiklere direnç ile virulans genleri arasında değişken bir ilişkinin olabileceğini göstermektedir.

Tür olarak değerlendirildiğinde *E.faecalis* ve *E.faecium*'un virulans faktörü genleri taşıma oranları yönüyle büyük değişkenlik mevcuttur. Jovanovic ve ark. (2015) vankomisine dirençli *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarının *esp* pozitifliği yönüyle sırası ile %29,2 ve %76 olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada başka bir virulans geni *hyl* için tersi bir sonuç ortaya çıkmış ve *hyl* pozitif *E.faecalis* izolatına rastlanmamıştır. Brezilya'da yapılan bir çalışmada ise (Comerlato ve ark. 2013) *asaI* ve *gelE* genleri *E.faecalis* izolatlarında daha yüksek oranda bulunurken *esp* geni *E.faecium* izolatlarında daha yaygın bulunmuştur. Bu çalışma sonuçları da virulans geni içerme bakımından *E.faecalis* ve *E.faecium*'un oldukça değişken pattern gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Bu değişkenliğin kaynağının ise tür farkından ziyade etkenlerin izole edildikleri materyal ve bireyin durumu, dış çevre ve izolatlar arası klonal ilişkinin daha önemli belirleyici olmasının muhtemel olduğu düşünülmüştür.

Enterokokların klinik veya surveyans örneklerinden izole edilme durumunun virulans faktörlerinin bulunması açısından bir belirleyici olabileceği düşünülmektedir. Terkuran ve ark. (2014) araştırdıkları altı virulans faktörü gen içinde biri dışında diğerlerinin klinik izolatlarda gıda örneklerinden izole edilenlere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada araştırılan 162'si klinik ve 38'i surveyans örnekler arasında klinik izolatlardan 51'i çoklu ve 97'si tekli virulans geni içerirken limitli sayıdaki surveyans izolatlarından sadece ikisi çoklu olmak üzere 35'i tekli virulans genine sahip olarak bulundu. Herhangi bir virulans geni içermeyen izolat sayısı ise klinik örnekler için 13 surveyans örnekleri için bir olarak

ortaya çıktı. Bu değişken sonuçlar etkenlerin izole edildiği materyal ve virulans özellikleri ilişkisini değerlendirmek için sağlıklı sonuçlar ifade etmemektedir.

Bakterilerde virulans faktörü genlerin bulunması o etkenin aynı zamanda fenotipik olarak bu virulans özelliğine sahip olduğunu göstermez. Nitekim Terkuran ve ark. (2014)'nın çalışmasında bazı enterokokların virulans faktörü genlere sahip olmalarına rağmen bu özelliklerinin fenotipik olarak gözlemlenmediğini belirlemişlerdir. Özellikle jelatinaz ve sitolizin ilişkili genlerin bulunmasının bu fenotipleri ortaya çıkarmadığı başka araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir (Eaton ve Gasson 2001, Semedo 2003). Bu bakımdan mevcut çalışma sadece virulans genlerini belirleyerek bu patojenite potansiyelini ortaya koymakta olup bu genlerin sessiz olup olmadıkları, hangi çevresel şartlarda transkribe veya transle olabileceği ve konakçı olarak insan üzerinde bu özelliklerinin durumu ile ilgili bilgileri ileriki detaylı araştırmalara bırakmaktadır.

Mevcut çalışmada etkenin popülasyon dinamiği düşünöldüğünde oldukça sınırlı bir birim olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı izolatları analiz edilmiş olup araştırılan enterokokların yakın genetik ilişkili olması muhtemeldir. Bu nedenle, klonal ilişkisi ve genotipleri bilinen heterojen popülasyonlarda yapılan ileri çalışmalara da ihtiyaç bulunmaktadır.

Enterokokların hastane enfeksiyonlarındaki artan önemi ve antibiyotiklere direnç sıklığındaki artış düşünöldüğünde bu etkenlerin hastalık yapma gücü ve şiddeti ile ilişkili virulans faktörlerin ve bunların dinamiğinin belirlenmesi bu etkenlerin neden oldukları hastalıklarla mücadelede oldukça önemlidir. Enterokoklarda direnç çalışmalarının yaygın olmasına rağmen virulans belirleyicileri yönüyle yapılan taramalar sınırlıdır. Bu çalışmada ortaya çıkan yüksek oranda virulans faktörü genleri bu etkenlerde başta *esp*, *gelE* ve *cylB* olmak üzere diğer virulans belirleyicilerinin de dikkatle izlenmesinin uygun kontrol ve mücadele yöntemleri için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, virulans faktörlerinin belirlenmesi bunları hedef alarak antimikrobiyallerin geliştirilmesi potansiyeline katkı sunarak özellikle antibiyotiklere direnç sorunu olan enterokoklar için alternatif etkin ve güvenli bir mücadele yöntemi olarak gelecek çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Arda M. Tıbbi Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, 4.baskı, Ankara; 2011:s.510-517.
- Akçimen B. Hastane infeksiyonlarından izole edilen vankomisin dirençli enterokokların pulsed field jel elektroforez yöntemiyle genotip tayini. 2010, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 116 sayfa, Adana, (Prof. Dr. Fatih Köksal).
- Akdemir Y. Enterokok suşlarında antibiyotik direnç profilinin saptanması. 2010, Afyonkocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81 sayfa, Afyonkarahisar, (Doç. Dr. Orhan Cem Aktepe).
- Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2009; 23(4):201-209.
- Alp Ş, Çetinkaya Şardan Y. Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. Hacettepe Tıp Derg. 2008; 39(2):89-95.
- Altaş K. Hastane İnfeksiyonları ve Yeni Yaklaşımlar. İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayınları, İstanbul; 2002;s.56-71.
- Başustaoglu A, Aydoğan H. Enterokoklar. Uzun Ö (Ed.). İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; 2002;5(2):s.45-60.
- Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Cıtil BE, Turan D, Ongen B, Özyurt M, Açikel CH, Haznedaroğlu T. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary Enterococcus isolates. Mikrobiyol Bul. 2011; 45(3):430-445.
- Berzeg D. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen enterokok suşlarında antibiyotik direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci ve E-test ile vankomisin MİK değerlerinin değerlendirilmesi. 2005, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 96 sayfa, İstanbul, (Dr. Özcan Nazlıcan).
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir; 1990;s.225.
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, 3.Baskı, İzmir; 2002:s.495-523.
- Bilström H. Molecular epidemiology of clinical *E.faecium*. 2008, Division of Clinical Microbiology Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, PhD Thesis, 61 page Stockholm, (Bodil Lund, DDS, PhD).
- Bukharin OV, Valysheva IV, Kartashova OL, Sycheva MV. Characteristic of virulence potential of clinical isolates of *Enterococci*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2013; 3(2):12-18.

- Çakırlar FK, Samasti M, Barış I, Kavaklı H, Karakullukçu A, Sirekbasan S, Bağdatlı Y. The epidemiological and molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from rectal swab samples of hospitalized patients in Turkey. *Clin Lab* 2014; 60(11):1807-1812.
- Çaylan R, Üstünakın M, Kadımov V, Aydın K, Köksal İ. Fekal ve klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2004; 34:24-28.
- Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* 2012; 2(1):53-62.
- Çiçekler-Tok N. Enterokoklarda vankomisin direnci. 2006, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 50 sayfa, İstanbul, (Doç. Dr. Paşa Göktaş).
- Çopur S, Şahin Ş, Göçmen F, Sedef J. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and resistant *Enterococci* isolated from clinical samples. *Turk J Med Sci.* 2016; 46(3):877-891.
- Çöleri A, Çökmüş C. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. *Turk Hij Den Biyoloji Derg.* 2008; 65(2):87-96.
- D'Agata EM, Gerrits MM, Tang YW, Samore M, Kusters JG. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001; 22(9):550-554.
- Dahlen G, Blomqvist S, Almstahl A, Carlen A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in *Enterococci* isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol* 2012; 7:462.
- Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus *Enterococcus*: In: Taxonomy in Prokaryotes. Falkow S, Dworkin M, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (Eds). 3<sup>th</sup> ed. New York: Springer, 2006: p.163-174.
- Day AM, Sandoe JAT, Cove JH, Phillips-Jones MK. Evaluation of a biochemical test scheme for identifying clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Lett Appl Microbiol.* 2001; 33(5):392-396.
- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. pheno and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88(2-3):165-188.
- Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001; 67(4):1628-1635.
- Ergin MA, Şener B, Akyön Y, Berkman E. A grubu  $\beta$ -hemolitik streptokokların ve enterokokların hızlı tanısında PYR testi. *Klinik Derg.* 1995; 8(1):36-37.

- Facklam RR, Teixeria LM. Enterococcus. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections. Collier L, Bolows A, Sussman M. (Eds.). 9th edition, Wiley-Blackwell press, London, United Kingdom; 1998:669-682.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009; 155(5):1749-1757.
- Gözalan A, Coşkun-Arı FF, Özdem B, Ünaldı Ö, Çelikkbilek N, Kırca F, Aydoğan S, Muderris T, Güven T, Açıkgöz ZC, Durmaz R. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital Turkey. J Med Microbiol 2015; 64(7):759-766.
- Grayson ML, Grabsch AE, Johnson PDR. Outcome of a screening program for vancomycin-resistant *Enterococci* in a Hospital in Victoria. MJA 1999; 171(3):133-136.
- Gültekin M. Enterokoklar: İçinde: Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. (Ed.). Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004; s. 121-140.
- Harris AD, Nemoy L, Johnson JA, Martin-Carnahan A, Smith DL, Standiford H, Perencevich TR. Co-carriage rates of vancomycin-resistant *Enterococcus* and extended-spectrum betalactamase-producing bacteria among a cohort of intensive care unit patient: implication for an active surveillance program. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004; 25(2):105-108.
- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van-Embden JDA, Willems RJL. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2002; 40(1):963-971.
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. Clin Microbiol Rev. 1994; 7(4):462-478.
- Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF. Adhesion and virulence factor properties of *Enterococci* isolated from clinical samples in İran. Indian J Pathol Microbiol. 2013; 56(3):238-242.
- Karagöz G. Yoğun bakım ünitesinde vankomisin dirençli enterokok taşıyıcılığının araştırılması. 2005, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 52 sayfa, İstanbul, (Uzm. Dr. Öznur Ak).
- Kasaroğlu K. *Enterococcus faecium* klinik izolatlarında çoklu ilaç dirençlilik mekanizmalarının genetik doğası. 2013, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 116 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Mustafa Akçelik).
- Kayaoğlu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15:308-320.

- Keskin S, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezinde hastanede yatan hastalarda vankomisin dirençli enterokok (VRE) taşıyıcılığının geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve hastanede yatış süresi ile ilişkisi. 2014, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 63 sayfa, Edirne, (Prof. Dr. H. Murat Tuğrul).
- Comerlato CB, Resende MCC, Caierao J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(5):590-595.
- Korten V. Enterokoklar. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). Nobel Tıp Kitabevleri, 2.baskı, İstanbul. 2002; s.1497-1506.
- Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey B, Ditore V, Zaman K, Patel K, Saurina G, Huang W. Comparison of selective media for identifying fecal carriage of vancomycin resistant *Enterococci*. J Clin Microbiol. 1996; 34(3):751-752.
- Mahalleh AA, Göncüoğlu M. Enterokokların önemli virulans faktörleri ve gıdalarda bulunuşu. Etlik Vet Microbiol. 2014; 25(2):47-52.
- Murray BE. Vancomycin-resistant *Enterococci*. Am J Med. 1997; 102(3):284-293.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2008. Medical Microbiology. Tıbbi Mikrobiyoloji. Başustaoğlu AC (Editör). Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010; s.243-246.
- Öncül O. Vankomisin ve teikoplanin hikayesi. ANKEM Derg. 2010; 24(Ek 2)101-109.
- Öztürk R, Saltoğlu N, Aygün G. Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri Sempozyumu Dizisi, İstanbul, 2008.
- Park YJ, Oh EJ, Kim BK, Kim SM, Shim SI. Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E.faecium* polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999; 34(4):269-273.
- Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance infection control and hospital epidemiology. Centers for disease control and prevention's hospital infection control practices advisory committee (HICPAC) special report. 1995; 16(2):105-113.
- Robert C, Moellering RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Principle and Practice of Infectious Disease. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. (Eds.). 6<sup>th</sup> ed. Elsevier Churchill Livingstone, 2005; p. 2411-2417.
- Sabia C, de Niederhäusern S, Guerrieri E, Messi P, Anacarso I, Manicardi G, Bondi M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. J Appl Microbiol. 2008; 104(4):970-979.


- Sayiner S. Hastanemizde srveyansla saptanan VRE'lerin dağılımları, antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalarda risk faktrlerinin değerlendirilmesi. 2008, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 66 sayfa, İstanbul, (Dr. Taner Yıldırım).
- Sedgley CM, Molander A, Fiannagen SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlen G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20(1):10-19.
- Semedo T, Santos MA, Lopes MF, Figueiredo-Marques JJ, Barreto-Crespo MT, Tenreiro R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? Syst Appl Microbiol. 2003; 26(1):13-22.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3):512-530.
- Son R, Nimita F, Rusul G, Nasreldin E, Samuel L, Nishibuchi L. Isolation and molecular characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. Lett Appl Microbiol. 1999; 29(2):118-122.
- Silianpa J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. Journal of Clin Microbiol. 2009; 47(4):896-901.
- Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. In Brazilian Journal of Infectious Diseases 2016; 20(2):127-133.
- Svec P, Devriese LA, Sedlacek I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, Swings J, Doskar J. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov. isolated from water. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(4):1567-1574.
- Shankar N, Brahdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pig in Denmark. J Clin Microbiol. 2006; 44(11):4200-4203.
- Taşova Y, İnal AS. Enterokok İnfeksiyonlarında Klinik. İçinde: Yeni ve Yeniden Gndeme Gelen İnfeksiyonlar. şardan Y. (Ed). Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 2004; s.17-24.
- Taşbakan MI. Vankomisine dirençli enterokok olguları. ANKEM Derg 2010; 24(Ek 2):82-84.
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: New developments in the 21st century. Mol Life Sci. 2003; 60(12):2622–2636.

- Terkuran M, Erginkaya Z, Ünal E, Güran M, Kizilyildirim S, Ugur G, Köksal F. The relationship between virulence factors and vancomycin resistance among enterococci collected from food and human samples in Southern Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2014; 61(2):133-140.
- Ural O. Nozokomiyal enterokok bakteriyemisi. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1998; 2(4):217-223
- Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin resistant *Enterococci*. *Lanset* 1998; 1(8576-8567):57-58.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Eskulin ve Safra-Eskulin Testleri. Türk Halk Sağlığı Kurumu, 2015.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Katalaz Testi. Türk Halk Sağlığı Kurumu, 2015.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Optokin Duyarlılığı Testi. Türk Halk Sağlığı Kurumu, 2015.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, PYR Testi. Türk Halk Sağlığı Kurumu, 2015.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Tuz-Tolerans Testi. Türk Halk Sağlığı Kurumu, 2015.
- Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, (bölüm ed.). Güneş Kitabevi, Ankara, 1999; s.736-737.
- Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, 2.baskı, Ankara, 2012; s.527.
- Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Snauwaert C, Swings J, Klare I, Witte W, Van Autgaerden T, Chapelle S. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(14): 4247-4255.
- Werner G, Coque TM, Hemmerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Jonshon A, Klare I, Kristinsson KG, Leclencq R, Lester CH, Lillie M, Novais C, Olsson-Liljequist B, Peixe LV, Sadowy E, Simonsen GS, Top J, Vuopio-Varkila J, Willems RJ, Witte W, Woodford N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveil.* 2008; 13(47):1-11.
- Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, 6<sup>th</sup> ed. Baltimore Philadelphia, 2006; p.40-643.
- Yüksel FN. 2012. Gıda kaynaklı *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında virulans faktörlerin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 94 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Mustafa Akçelik).



## 8. EKLER

### Ek. 1. ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ CİLTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

| KONTROL BAŞLIĞI   | ÖĞRENCİ   | DANIŞMAN                                  |
|---|---|---|
| Tez yazımında kullanılan yazı tipi  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Sayfa kenar boşlukları  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Kapak sayfası düzeni  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| İç kapak sayfası düzeni   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Onay sayfası düzeni   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Beyan sayfası içeriği ve düzeni   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| İçindekiler sayfası düzeni  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Teşekkür sayfası  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Türkçe özet   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| İngilizce özet  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Simgeler ve kısaltmalar dizini  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Şekiller dizini   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Tablolar dizini   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Tezin ön sayfalarının sıralaması  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Ön sayfaların numaralandırılması  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Sayfalarının numaralandırılması   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Başlıklarının numaralandırılması  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Şekil, resim ve tablo numaralandırması  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Yöntem ve Gereç   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Bulgular  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Tartışma  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Sonuç ve Öneriler   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Kaynaklar   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Atıflar (alıntı ve göndermeler)   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Ekler (etik kurul onayı, vs)  | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Tez planı   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Dil (anlatım, yazım-imla)   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Kâğıt ve baskı özelliği   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Tezin son şeklinin elektronik kopyası   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN   | <input checked="" type="checkbox"/> UYGUN |
| Tarih: 29.09/2016<br>Öğrencinin<br>Adı ve Soyadı,<br>Narçın Muriqi<br>İmza<br> | Tarih: 29/09/2016<br>Danışmanın<br>Adı ve Soyadı,<br>Prof.Dr. Ahmet Ünver<br>İmza<br> |   |

## Ek 2. Etik Kurul Onay Formu

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 18920478-050.01.04/8687  
Konu : Başvuru İncelemesi

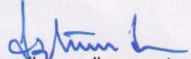
27.01.2016

Sayın Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Enterokok İzolatlarında esp, cy1B ve ge1E Virülans Faktörü Genlerinin Belirlenmesi" başlıklı 2011-KAEK-27/2016-161 nolu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 20/01/2016 tarih ve 01-01 nolu kararı aşağıdadır. Bilgilerinize rica ederim.

**Karar Tarihi** : 20.01.2016 14:30  
**Karar No** : 2016-01

**Karar-01**) 2011-KAEK-27/2016-161 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje araştırmacılarından Narçın MURİQ'nin sunumunun dinlenmesinin ve raportörün hazırladığı değerlendirilmenin okunması sonrasında yapılan oylamada "**ETİK KURUL ONAYINI ALIR.**" kararı verilmiştir.

  
Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR  
Başkan

27.01.2016 Sekreter : Faize OTURAN

Bilgi için: Faize OTURAN  
Sekreter

### Ek 3. Özgeçmiş

#### Kişisel Bilgiler

|                   |                           |                     |             |
|-------------------|---------------------------|---------------------|-------------|
| <b>Adı</b>        | Narçın                    | <b>Soyadı</b>       | Muriqi      |
| <b>Doğum Yeri</b> | Prizren                   | <b>Doğum Tarihi</b> | 14.03.1991  |
| <b>Uyruğu</b>     | Kosova                    | <b>TC Kimlik No</b> | 99376270070 |
| <b>E-mail</b>     | narcin.muriqi@outlook.com |                     |             |

#### Eğitim Düzeyi

|                      | <b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>                                   | <b>Mezuniyet Yılı</b> |
|----------------------|---|-----------------------|
| <b>Yüksek Lisans</b> | Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi<br>Sağlık Bilimleri Enstitüsü | 2014 - (Halen)        |
| <b>Lisans</b>        | Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi                                 | 2009-2013             |

#### İş Deneyimi

| <b>Görevi</b>                 | <b>Kurum</b>                         | <b>Süre</b>           |
|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| <b>Öğretmen</b>               | Elena Cika İlk ve Orta Öğretim Okulu | 01.02.2014-30.06.2014 |
| <b>Laboratuvar teknisyeni</b> | Prizren Halk Sağlığı Merkezi         | 12.08.2013-28.02.2014 |

#### Katıldığı Bilimsel Etkinlikler:

ODAK Brucella Kit ve Ekipman Eğitimi

Trakya Üniversiteler Birliği (TÜB) 2016 Lisansüstü Öğrenci Kongresi