



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KANDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS*  
TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN FENOTİPİK VE  
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zeynep ÖZKÖK**

**Samsun**

**Kasım – 2018**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KANDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS*  
TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN FENOTİPİK VE  
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zeynep ÖZKÖK**

**Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN**

**Samsun**

**Kasım – 2018**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Zeynep ÖZKÖK tarafından Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN danışmanlığında hazırlanan “Kandan İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Fenotipik Ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 30.11.2018 tarihinde yapılan sınav ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ  
(Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN  
(Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye : Doç Dr. Yeliz ÇETİNKOL  
(Ordu Üniversitesi)

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

...../...../.....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve ilgisini eksik etmeyen, bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, akademik çalışmaların her aşamasında karşılaştığım güçlükleri aşmamda yardımını esirgemeyen, bilgi ve birikimi ile bana yol gösteren değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN'e minnettarlığımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım boyunca bilgi, ilgi ve yardımseverlikleriyle desteklerini gördüğüm ve her zaman rehberliklerine başvurduğum değerli hocalarım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ, Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Belma DURUPINAR, Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI ve Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süresince bana pek çok konuda destek olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı asistanları, doktora ve yüksek lisans öğrencileri ve de laboratuvar çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve bu süreçte moral ve motivasyon kaynağım olan anneme, babama, abime, yengeme ve yeğenlerime sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde yanımda olan birçok konuda desteklerini hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Enes HANÇER, Cengiz NİGİZ ve Ebru EĞİLMEZ'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.18.001 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ÖZET

### KANDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

**Amaç:** Çalışmamızda, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türlerinin vankomisin direnç durumlarının belirlenmesi ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen *esp* gen varlığının polimeraz zincir reaksiyonu ile, genel biyofilm oluşturma kapasitelerinin de fenotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmaya kan kültüründen izole edilen toplam 170 adet *Enterococcus* izolatu dahil edilmiştir. Türlerin tanımlanması, konvansiyonel ve otomatize yöntemler kullanılarak yapılmıştır. İzolatların vankomisin duyarlılıkları, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Tüp ve Mikrotitrasyon plak yöntemleri kullanılarak biyofilm oluşumu fenotipik olarak değerlendirilmiştir. Tüm izolatlarda, PZR yöntemi ile, biyofilmle ilişkili *esp* geninin varlığı incelenmiştir.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen suşların vankomisin duyarlılıkları incelendiğinde, *E. faecalis* izolatlarının 14 tanesi (%16,5) orta duyarlı, 1 tanesi (%1,2) dirençli; *E. faecium* izolatlarının ise 29 tanesi (%34,1) dirençli olarak bulunmuştur. Tüp yöntemi ile 5 suşun (%5,9) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile ise 27 suş (%31,8) pozitif olarak tespit edildi. Her iki fenotipik yöntemde de pozitif olan suşların tamamının *E. faecalis* olduğu görülmüştür. PZR işleminin sonucunda 49 (%57,6) *E. faecalis*, 20 (%23,5) *E. faecium* suşunda *esp* varlığı saptanmıştır.

**Sonuç:** Bu sonuçlara göre *E. faecalis* izolatlarının biyofilm oluşumu kapasitelerinin *E. faecium*'a göre daha fazla olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *esp* geninin biyofilm oluşumu ile ilgisi olabileceği ancak tek başına *esp* varlığının biyofilm oluşumu için yeterli olamayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, biyofilm, *esp*

Zeynep ÖZKÖK, Yüksek Lisans Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Kasım - 2018

## ABSTRACT

### BIOFILM FORMATION OF *ENTEROCOCCUS* SPECIES ISOLATED FROM THE BLOOD TO BE INVESTIGATED BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

**Aim:** In our study, it was aimed to determine the vancomycin resistance status *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species and to studied on presence of esp gene which is thought to be related to general biofilm formation capacity with polymerase chain reaction and and general biofilm formation capacity by phenotypic methods.

**Material and Method:** A total of 170 *Enterococcus* spp. isolates that were isolated from blood culture were included in the study. Species identification was performed using conventional and automated methods. Vancomycin susceptibilities of isolates were determined by Kirby-Bauer disk diffusion method. Biofilm formation was evaluated phenotypically by using Tube and Microtitration plate methods. In all isolates, the presence of esp gene which is associated biofilms was investigated by PCR method.

**Results:** When the vancomycin susceptibilities of the strains included in the study were examined, it was found that 14 of the *E. faecalis* isolates (16.5%) were susceptible and 1 of them was (1.2%) resistant. And 29 (34.1%) of *E. faecium* isolates were found to be resistant. It was determines that 5 strains (5.9%) formed biofilm by tube method. By Microtiter plate method, 27 (31.8%) tested strains were determined positive for biofilm formation. All strains that were positive in both phenotypic methods were found to be *E. faecalis*. And 49 (57.6%) *E. faecalis* and 20 (23.5%) *E. faecium* strains were found positive esp.

**Conclusion:** According to these results, *E. faecalis* isolates are thought to have higher biofilm formation capacity than *E. faecium*. Furthermore, it is thought that the esp gene may be related to biofilm formation but the presence of esp alone is not sufficient for biofilm formation.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, biofilm, esp

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>CDC</b>	: Centers for Disease Control and Prevention
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DNase</b>	: Deoksiribonükleaz
<b>EMB</b>	: Eozin Metilen Blue
<b>EPS</b>	: Ekstraselüler Polimerik Maddeler
<b>ESP</b>	: Enterokokal Yüzey Proteini
<b>EUCAST</b>	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>I</b>	: Orta Düzeyde (intermediate)
<b>İYE</b>	: İdrar Yolları Enfeksiyonu
<b>MBBC</b>	: Minimum Biyofilm Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MDR</b>	: Çoklu İlaç Direnci
<b>MHA</b>	: Muller Hinton Agar
<b>MİK</b>	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
<b>MMP</b>	: Matriks Metalloproteinaz
<b>MTP</b>	: Mikrotitrasyon Plak Yöntemi
<b>MSCRAMM Ace</b>	: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
<b>PYR</b>	: Pirolidonil- $\beta$ -naftilamidi
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>R</b>	: Dirençli
<b>RNase</b>	: Ribonükleaz
<b>rRNA</b>	: Ribozomal RNA
<b>S</b>	: Duyarlı
<b>TSB</b>	: Triptikaz Soy Buyyon
<b>VSE</b>	: Vankomisin Duyarlı Enterokok
<b>VRE</b>	: Vankomisin Dirençli Enterokok



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Enterokokların Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji .....	3
2.1.2. Sınıflandırma .....	4
2.1.3. Morfoloji.....	5
2.1.4. Kültür Özellikleri.....	5
2.1.5. Biyokimyasal Özellikler .....	5
2.1.7. Virulans Faktörleri.....	8
2.1.8. Enterococcus Enfeksiyonları .....	10
2.1.9. Antimikrobiyal Direnç.....	11
2.1.10.Glikopeptid Direnci .....	11
2.2. Biyofilm.....	12
2.2.1. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi .....	12
2.2.2. Biyofilmin Yapısı .....	14
2.2.3. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Sebepleri.....	14
2.2.4. Biyofilm Oluşum Basamakları .....	15
2.2.5. Biyofilm Hastalık İlişkisi.....	16
2.2.6. Quorum Sensing .....	17
2.2.7. Biyofilmde Antimikrobiyal Direnç .....	17
2.2.8. Enterococcus Türleri ve Biyofilm .....	18

<b>3. MATERİYAL VE METOT .....</b>	<b>19</b>
3.1. MATERİYAL .....	19
3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatlar .....	19
3.2. METOT .....	19
3.2.1. Bakterilerin Tanımlanması .....	19
3.2.2. Antimikrobiyal Direncinin Belirlenmesi .....	19
3.2.3. Vitek 2 Compact Otomatize Sistemi .....	20
3.2.4. Disk Difüzyon Yöntemi.....	20
3.2.5. Biyofilm Varlığının Araştırılması .....	20
3.2.6. Tüp Yöntemi.....	20
3.2.7. Mikrotitrasyon Plak Yöntemi .....	21
3.2.8. Moleküler Yöntemler .....	22
3.2.9. İstatistiksel Analiz .....	24
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>25</b>
4.1. Vankomisin direnci.....	26
4.2. Fenotipik Testlerin Biyofilm Sonuçları.....	27
4.3. <i>esp</i> varlığının PZR ‘ile tespiti .....	29
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>38</b>
<b>6.SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>45</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>58</b>

## 1. GİRİŞ

Enterokoklar yıllarca *Streptococcus* cinsinin ana gruplarından biri olarak kabul edilmiş ancak, yapılan genetik analizler sonucunda *Streptococcus* cinsinden ayrılarak *Enterococcus* cinsi olarak tanımlanmaya başlanmıştır (Akan, 2009). Enterokok cinsi içinde 18 farklı tür bulunmakla birlikte, insanda en sık enfeksiyon oluşturan türler *Enterococcus faecalis* (tüm enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından sorumludur) ve *Enterococcus faecium*'dur (antibiyotiklere daha dirençli olma eğilimindedir) (Tünger ve ark., 2005). Fakültatif anaerob olan *Enterococcus* cinsi üyeleri, katalaz negatif, gram pozitif tekli, ikili ya da kısa zincir oluşturan koklardır (Akan, 2009). Optimal üreme ısıları 35°C olup, 10-40°C arasındaki ısılarda da üreyebilirler (Durmaz, 2008). Zorlu çevre koşullarında yaşayabilir ve üreyebilirler. Doğada yaygın olarak; toprak, su, bitkiler, besinler, memeliler, kuşlar, böcekler ve sürüngenler dahil hemen her yerde yaşamlarını sürdürebilirler (Akan, 2009).

Enterokok türlerinin prevalansı; yaş, diyet, altta yatan hastalıklar ve antibiyotik kullanımı gibi fizyolojik şartları etkileyen faktörlere bağlı olarak, konağa göre değişir. Gastrointestinal sisteminde bulunan enterokoklar, hastalıklara neden olan suşların önemli bir kaynağı olarak kabul edilmektedir (Akan, 2009).

Sahip oldukları mobil genetik elementler nedeni ile son yıllarda önemli ölçüde kazanılmış direnç geliştirmişlerdir. Bunlar içinde en önemli olanları yüksek düzeyde aminoglikozid direnci, glikopeptid direnci,  $\beta$ -laktamaz yapımı veya diğer mekanizmalar ile gelişen yüksek düzey penisilin direncidir (Korten, 2003).

Vankomisin, 1950'li yıllarda keşfedilen ilk glikopeptid antibiyotığıdır (Murray ve Nannini, 2005). Dünyadaki ilk vankomisine dirençli *Enterococcus* suşu 1988 yılında Uttley ve ark. (Uttley, 1988) tarafından İngiltere'de; Türkiye'de vankomisine dirençli *Enterococcus* suşu ise 1998 yılında, Akdeniz Üniversitesi'nde Vural ve ark. (1999) tarafından tanımlanmıştır.

Enterokoklar; menenjit, solunum sistemi enfeksiyonları, endokardit, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları, bakteremiler, yara ve doku enfeksiyonları ve neonatal sepsise neden olabilirler (Özkaya Şahin, 2003).

Virülansını açıklayan faktörler henüz tam olarak netlik kazanmamıştır (Durmaz, 2008; Akan, 2009). Ancak enterokokal yüzey proteini (*esp*), agregasyon faktörü, lipoteikoik asit, bakteriyosin, jelatinaz, serin proteaz ve hiyaluronidaz patojenite faktörleri oldukları düşünülmektedir (Arıkan Akan, 2009). Bunların içinde *esp*'nin hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*'un biyofilm oluşturma yeteneğiyle ilişkilendirildiği yayınlar mevcuttur (Sava ve ark., 2010). Biyofilm; mikroorganizmanın, bir yüzey, ara yüzey ya da birbirlerine geri dönülmez olarak bağlayan, ekstrasellüler polimerik maddeden oluşan bir matriks içerisine yerleşmesi olarak tanımlanabilir (Donlan ve Costerton, 2002).

*E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde bulunan virülans faktörleri, biyofilm oluşturarak konakça da kolonize olmalarında ve enfeksiyonu başlatmalarında rol alabilirler (Sava ve ark., 2010). Çeşitli akademik çalışmalarda farklı örneklerden izole edilen suşlarda, biyofilm oluşumu araştırılmakla beraber tamamı kan izolatu olan çalışmalara çok sık rastlanmamaktadır (Donlan ve Costerton, 2002; Fallah ve ark 2017).

Sağlık kuruluşlarının kendi hasta profilini, hastane florasını oluşturan mikroorganizmaları ve bunların direnç paternlerini bilmesi, doğru stratejilerin geliştirilmesini sağlayacaktır (Şardan, 2008).

Çalışmamızda, *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* türlerinin vankomisin direnç durumlarının belirlenmesi ve biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen *esp* gen varlığının polimeraz zincir reaksiyonu ile, genel biyofilm oluşturma kapasitelerinin de fenotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Enterokokların Genel Özellikleri

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Enterokoklar yapısal karakterleri sayesinde zorlu çevre koşullarında üreyebilir ve yaşamlarını sürdürebilirler. Toprak, su ve yiyeceklerde bulunabilirler. Memeliler, böcekler, kuşlar ve sürüngenler gibi hayvanlarda ve ayrıca insanların da gastrointestinal sisteminde yüksek düzeyde bulunabilirler. Enterokoklar barsakta kolonize olan en yoğun gram pozitif koklardır. Barsaklardaki en yoğun enterokok türü *E. faecalis*'tir. Diğer enterokok türleri (*E. faecium*, *E. gallinarum* ve *E. durans*) insanların gastrointestinal sisteminde farklı oranlarda bulunabilirler. Enterokoklar dışkıda yoğun olarak bulunmakta ve zorlu çevre şartlarına karşı dayanıklı olduklarından dolayı buldukları ortamda canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Bu sebeple alınan süt, gıda ve suyun hijyen açısından ne durumda olduğu ve dışkı kontaminasyonunun olup olmadığının belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılabilir (Arıkan Akan, 2009; Teixeira ve ark., 2009).

Enterokoklar hastanelerde idrar yolu, yara ve kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkarken; toplumda ise endokardit etkeni olarak görülebilmektedir. Önceden flora bakterisi olarak bilinmelerine karşın, günümüzde önemli bir hastane enfeksiyonu haline gelmiştir. Bu durum az da olsa enterokokların sefalosporinlere karşı olan doğal direncine bağlanabilir (Gülay ve ark., 2008). Enterokokların neden olduğu enfeksiyonların %60'ı nozokomiyal olmakla birlikte bu enfeksiyonların yaklaşık yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlardan *E. faecalis* %80-90 oranında, *E. faecium* ise %5-10 oranında sorumludur (Durmaz, 2008).

Altta yatan ciddi hastalıklar, immünsüpresyon, renal yetmezlik, hastanede veya yoğun bakım ünitesinde uzun süre tedavi görme, hastaların hastane içindeki katlar arasındaki nakilleri, antibiyotik kullanımı nozokomiyal enterokok enfeksiyonu için risk faktörleridir (Durmaz, 2008).

### 2.1.2. Sınıflandırma

*Streptococcus faecalis* (dışkıyla ilgili faecalis) adı ilk kez 1906 yılında, endokarditli bir hastadan bu organizmayı izole eden ve aynı zamanda insan bağırsağının karakteristiği olduğunu düşünen, Andrewes ve Horder tarafından ortaya atılmıştır (Murray, 1990). Sherman (1937)'de yapmış olduğu derlemede streptokokları piyojenik, viridans, laktik ve enterococcus olmak üzere dört bölüme ayıran bir sınıflandırma şeması önermiştir (Sherman, 1937).

1940-50'lerde yapılan bazı çalışmalarda, *S. faecium*'u *S. faecalis*'den ayıran biyokimyasal özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Bu farklılıklar arasında potasyum tellürit ile inhibisyon, fermentasyon reaksiyonları ve tetrazolumu formazan'a indirgeyememe özellikleri gösterilebilir (Barnes, 1956; Deibel, 1964; Hartman ve ark., 1966). Günümüzde yeni enterococcus tanımlama kriterleri arasında, DNA-DNA reasosiyasyon deneyleri, 16S rRNA gen sekanslaması ve total protein profil analizi gibi farklı moleküler tekniklerin ve fenotipik testlerin sonuçlarını irdeleyen polifazik yaklaşımlar bulunmaktadır (Teixeira ve ark., 2009).

Enterokok türleri; üreme özellikleri, fermentasyon testleri, hareket ve pigment gibi fenotipik özelliklere göre 5 gruba ayrılırlar (Arkan Akan, 2009). Bu gruplar Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Fenotipik özelliklere göre enterokok türlerinin sınıflandırılması (Arkan Akan'dan, 2009)

<b>Grup I</b>	<b>Grup II</b>	<b>Grup III</b>	<b>Grup IV</b>	<b>Grup V</b>
<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. canis</i>
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. villorum</i>	<i>E. sulfurens</i>	<i>E. moraviensis</i>
<i>E. raffinosus</i>	<i>E. casseflavus</i>	<i>E. ratti</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. phoeniculicola</i>	
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. dispar</i>	Enterococcus spp.	
<i>E. pallens</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>		PNS E1	
<i>E. gilvus</i>	Enterococcus spp.			
Enterococcus spp.	PNS E2			
PNS E3				

### 2.1.3. Morfoloji

*Enterococcus* cinsi, gram-pozitif kok şeklindeki mikroorganizmalardan oluşur. Boyalı preparatlarında ikili, tekli ya da kısa zincirler halinde görülebilirler. Kanlı agarda 24 saatlik inkübasyon sonunda 1-2 mm büyüklüğünde koloniler oluştururlar. Bazı varyantların boyutları daha da küçük olabilir (Teixeira ve ark., 2009).

### 2.1.4. Kültür Özellikleri

Enterokoklar, fakültatif anaerop mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısıları 35°C olmasına rağmen 10-45°C aralığında da üreme özelliği gösterebilirler. Koyun veya tavşan kanlı ya da %10 gliserollü besiyerinde -70°C’de uzun süre saklanabilir. Ayrıca basit besiyerlerinde bile canlılıklarını aylarca koruyabilirler (Gültekin, 2004).

Enterokoklar herhangi bir kanlı agarda kolayca üreyebilirler. *E. faecalis*’in bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturmadığı halde; içerisinde insan, at veya tavşan kanı olan besiyerinde beta-hemoliz yapabilirler. *E. durans*’ın bazı suşları ise besiyerinin içerdiği kana bakmazsızın, beta-hemoliz oluşturabilirler. Diğer enterokoklar ise kanlı agarda ya hemoliz oluşturmazlar ya da alfa/beta hemoliz oluşturabilirler (Gültekin, 2004).

Enterokoklar dış ortam koşullarına, fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı dayanıklı mikroorganizmalardır. %6.5 NaCl bulunan ortamlarda üreyebilirler. Enterokoların %40 safra-tuz içeren besiyerinde eskülini hidroliz etmeleri D grubu streptokoklardan ayrılmasında kullanılan bir özelliktir. Safra içeren Bile eskulin agarda enterokoklar hariç diğer gram pozitif bakteriler üreyemezler. Enterokoklar ise Bile eskulin agarda üreyebilir, besiyerindeki eskulini, eskulin ve deskstroza ayrıştırabilirler. Besiyerinin içerisinde bulunan renk indikatörü olan ferrik iyonlarıyla çökmesi sonucunda siyah-kahverengi pigment oluştururlar (Gültekin, 2004).

### 2.1.5. Biyokimyasal Özellikler

Karbonhidrat metabolizmaları bakımından fermantatif mikroorganizmalar olup; glikoz fermantasyonu sonucu son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Glikozdan gaz oluşturmama özelliği enterokokların *Leuconostoc* cinsinden ayırımında önemli bir özelliktir. Bu mikroorganizmalar sitokrom enzimi içermediği ve porfirin sentez edemediklerinden dolayı katalaz negatif bakterilerdir.

Fakat *E. faecalis* türlerinin kanlı besiyerine ekimleri sonucundan oluşan koloniler zayıf yalancı katalaz reaksiyonu gösterebilirler. Bazı enterokoklarda (*E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* hariç) pirolidonil arilamidaz enzimleri vardır ve PYRase aktiviteleri ile pirolidonil- $\beta$ -naftilamidi (PYR) hidroliz ederler. Enterokokların bu özelliği, vankomisin direnci sebebiyle karıştırılabilecek olan *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* türlerinden ve non-A grubu streptokoklardan ayırımında kullanılır. Enterokok türleri oksidaz negatiftir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* türleri hareketli diğer türler hareketsizdir (Gültekin, 2004).

Enterokok ve benzeri türlerin ayırt edici bazı üreme ve biyokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2’de verilmiştir (Gültekin, 2004).



**Tablo 2.** Enterokok ve benzeri türlerin ayırt edici özellikleri (Gültekin'den, 2004)

Test	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Abiotrophia*</i>	<i>Globicatella</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>
%6.5 NaCl'de üreme	+	v	+	-**	-	+	v	v
10°C'de üreme	+	+	+	-	V	-	+	-
45°C'de üreme	+	v	v	v	-	-	v	+
Hareket	v	-	+	-	-	-	-	-
Glikozdan gaz çıkarma	-	-	-	-	-	-	+	-
PYR	+	+	+	+, -***	+	+	-	-
LAP	+	+	+	+	+	-	-	+
Safra-eskulin	+	+	+	-****	-	-	v	v
Vankomisin duyarlılığı	S, R	S	S	S	S	S	R	R

PYR: L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide, LAP: Leucine aminopeptidase yapımı, +: > %95 pozitif reaksiyon, -: < %5 pozitif reaksiyon, v: Değişken, S: Duyarlı, R: Dirençli

\* Daha önceden beslenme yönünden eksik streptokoklar olarak bilinen mikroorganizmalar

\*\* Bazı beta-hemolitikstreptokoklar %6.5 NaCl'de ürerler

\*\*\* *S. pyogenes*, *S. iniae* ve *S. porcinus* PYR pozitif, diğerleri negatiftir

\*\*\*\* Viridans streptokokların %5-10'u safra-eskulin pozitifdir

### 2.1.7. Virulans Faktörleri

Enterokoklar, insanlar dahil birçok hayvanın gastrointestinal kanalında yaşayan gram pozitif bakterilerdir. Ancak, normalde bulunmadıkları habitatlarda kolonize oldukları zaman, bu fırsatçı bakteriler patojen etki gösterebilirler (Tendolkar ve ark., 2003). Özellikle hastane kaynaklı olan enterokok enfeksiyon insidansı son 25 yılda önemli ölçüde artmıştır. Son zamanlarda, enterokokların etken olduğu nozokomiyal enfeksiyonlar arasında postoperatif yara enfeksiyonları, kan ve idrar yolu enfeksiyonları (İYE) giderek daha fazla tespit edilmeye başlanmıştır (Vergis ve ark., 2002).

Enterokokların virülans mekanizmalarını açıklayan faktörler henüz yeterince netlik kazanmamıştır (Durmaz, 2008; Akan, 2009). Bunun yanında enterokokal yüzey proteini (*esp*), agregasyon faktörü, lipoteikoik asit, bakteriyosin, jelatinaz, serin proteaz ve hiyalüronidaz önemli patojenite faktörleri olarak bilinmektedir (Arıkan Akan, 2009). Bunların içinde *esp*'nin hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*'un biyofilm oluşturma yeteneğiyle ilişkilendirildiği yayınlar bulunmaktadır (Sava ve ark., 2010).

#### Ekstrasellüler Yüzey Proteini (*Esp*)

Enterokokal yüzey protein geni *esp*, hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*'da bulunabilmektedir (Shankar ve ark., 2002; Leavis ve ark., 2004). *Esp* proteinleri, her iki türde de bakterinin yüzeyinden eksprese edilir. Bunlar, N-terminal sinyal dizisini ve bir N-terminal bölgesinin ardından; A, B, C olarak adlandırılan üç tekrar bölge içerir ve bunların suşlar arasında değişen tekrar sayıda bulunur (Eaton ve Gasson, 2002; Leavis ve ark., 2004). *Esp*'in C-terminal ucu, hücre duvarına tutunmasından sorumlu olan bir (Y/F) PxTG motifinden oluşur. *E. faecalis*'te *esp*, idrar yolunun kolonize edilmesinde rol oynadığı varsayılan bir virülans faktörü olarak tanımlanmıştır (Shankar ve ark., 2001).

*Esp*'nin *E. faecalis*'de biyofilm oluşumundaki rolü, *esp* eksikliği olan mutantlarda incelendiğinde; biyofilm oluşumu kaybından belirgin bir etki olmamasına kadar değişik sonuçlar bildirilmiştir (Toledo-Arana ve ark., 2001; Tendolkar ve ark., 2004; Tendolkar ve ark., 2005).

### **Agregasyon faktörü (Asa)**

Agregasyon maddesi (Asa), donör ve alıcı bakteri arasındaki etkin teması aracılık eden ve plazmid değişimini kolaylaştıran, plazmid ile kodlanmış bir bakteriyel adheindir (Trotter ve Dunny, 1990). Bakteriyel konjugasyon işlemi sırasında yapışma işlevine ek olarak, renal tübüler hücreler ve bağırsak epitelyal hücreleri dahil olmak üzere, *E. faecalis*'in çeşitli ökaryotik hücrelere yapışmasına aracılık eder (Kreft ve ark., 1992; Olmsted ve ark., 1994).

### **Hemolizin/Sitolizin (Cyl)**

Eskiden hemolizin olarak adlandırılan sitolizin, *E. faecalis*'in çeşitli izolatlarında ifade edilmekte olan, çoğunlukla plazmid ile kodlanmış bir toksindir ve aynı zamanda bakteriyel kromozoma integre olarak da kodlanabilir (Ike ve Clewell, 1992). Sitolizine sahip suşların enfeksiyonu sonucunda oluşan nozokomiyal bakteriyemi sonrası ani ölüm riskini beş kat artırdığı tespit edilmiştir (Gültekin, 2004). Epidemiyolojik incelemeler, hastalık oluşumunda sitolizin rolünü kısmen desteklemektedir. Ike ve ark., (1987) *E. faecalis* klinik izolatlarının yaklaşık %60'ının hemolitik olduğunu, buna karşılık fekal örneklerden elde edilen *E. faecalis* izolatlarının sadece %17'sinin sağlıklı bireylerden olduğunu bildirmişlerdir (Ike ve ark., 1987).

### **Jelatinaz (GeIE)**

Jelatin; kollajen, fibrinojen, kazein, hemoglobün, insülin, bazı *E. faecalis* seksferomon ilişkili peptitleri ve diğer bazı biyoaktif peptidleri hidrolize edebilmektedir (Mäkinen ve ark., 1989).

### **Hiyaluronidaz (Hyl)**

Hiyaluronidaz, hiyalüronik asit (hiyalüronat, hiyalüronan) üzerinde etkilidir ve esas aktivitesinin bir sonucu olarak doku hasarıyla ilişkili bir degradatif enzimdir (Hynes ve Walton, 2000). Hiyaluronidaz bağ dokularının mukopolisakkarit parçasını depolimerize eder ve böylece bakteriyel invazyonu artırır (Kostyukova ve ark., 1995). Hiyaluronidazın (yayıma faktörü), bakterilerin yanı sıra toksinlerinin konak dokuları yoluyla yayılmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Kendi zararlı etkilerine ek olarak, diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerinin oluşumunu kolaylaştırır ve böylece hasarın büyüklüğünü artırabilir (Kayaoğlu ve Qrstavik, 2004).

### **Ekstrasellüler Süperoksit**

Süperoksit anyonu, inflamatuvar hastalıklar da dahil olmak üzere, çeşitli bozukluklarda hücre ve doku hasarında rol oynayan, yüksek oranda reaktif bir oksijen radikalidir. Süperoksit anyonu ve diğer oksijen radikalleri, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi çok çeşitli biyolojik bileşikler üzerinde yıkıcı bir etki yaparlar (Cross ve ark., 1987). Ekstrasellüler süperoksit üretiminin *E. faecalis* suşlarında yaygın bir özellik olduğu bildirilmiştir (Kayaoğlu ve Qrstavik, 2004)

### **Glikolipidler**

Son çalışmalar, bakteriyel virülansta enterokokal membran glikolipidlerinin önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Sava ve ark., 2009; Theilacker ve ark., 2009). Bu moleküller, sitoplazma ve çevre arasında geçirgen bir tabakanın oluşumunda rol oynarlar (Fischer ve ark., 1978a, 1978b).

### **2.1.8. Enterococcus Enfeksiyonları**

#### **Endokardit**

Endokardite neden olan etkenler içinde enterokokların %5-15 oranında olduğu görülmüştür. Diğer enterokok enfeksiyonlarında da olduğu gibi, en sık karşılaşılan tür *E. faecalis*'dir (Moellering, 1974; Garvey ve Neu, 1978; Scheld ve Mandell, 1984; Wilson, 1984). Ancak diğer enterokok türlerinin de bu hastalığa neden olabileceği bilinmektedir (Facklamve Collins, 1989).

#### **Bakteriyemi**

Enterokokal bakteriyemi, enterokokal endokarditten çok daha yaygındır (Murray, 1990). Enterokokkal bakteriyeminin kaynağı genellikle üriner sistemdir. Üriner sistem haricinde yumuşak doku ve intraabdominal enfeksiyonları sonucunda da bakteriyemi gelişebilir. Solunum sisteminin bakteriyemi kaynağı olma durumu çok nadir görülür. Eğer gram negatif bakterilerin yol açtığı hastalıklarla birlikte bakteriyemi görülürse; mortalite oranı oldukça yükselebilmektedir (Esen, 2004).

## **Üriner sistem enfeksiyonları**

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), özellikle hastanede yatan hastalar arasında, genellikle enterokoklar tarafından oluşturulmaktadır. Enterokokların ayrıca sistite, piyelonefrite, prostatit ve perinefrik apselere de neden olduğu bilinmektedir (Harding ve Ronald, 1974; Gross ve ark.,1976; Benno ve ark, 1986; Edelstein ve McCabe, 1988; Esen, 2004). İYE’de risk faktörleri olarak; cerrahi girişimler, enterokoklar, uzun süre sonda ve daha önceden antibiyotik kullanımı gösterilebilir (Murray, 1990).

## **Menenjit**

Enterokokal menenjit iatrojenik görülebildiği gibi spontan olarakta gelişebilmektedir. Menenjit tanısı konulan hastaların genelinde altta yatan kronik bir hastalık ya da immün sistemini baskılayıcı bir tedavi geçmişi vardır. Menenjit olma riskini artıran sebeplerin başında; santral sinir sistemi cerrahisi veya travma ile bu sisteme yabancı cisimlerin yerleştirilmesi gelmektedir. Çocuklarda ise menenjit olma riskini hidrosefali veya nöral tüp defekti artırmaktadır (Esen, 2004).

### **2.1.9. Antimikrobiyal Direnç**

Enterokoklar gram pozitif bakterilerde etkili olan antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli olması karşılaşılan sorunlardan biridir ve bu durum, mikroorganizmanın ya yapısal olarak doğal dirençli olması ya da daha sonradan kazanılmış antimikrobiyal direnç şeklinde görülür. Enterokoklar aminoglikozidler (düşük düzey), sefalosporinler, penisilin grubu (minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) kısmi yüksek) gibi antibiyotiklere karşı doğal direnç göstermektedir. Kazanılmış olan direnç ise transpozon ve plazmidlerin farklı mikroorganizmalardan aktarımı veya spontan mutasyonları sebebiyle oluşur (Arıkan Akan, 2009).

### **2.1.10.Glikopeptid Direnci**

Vankomisin, transglikosilasyonu bloke ederek ve transpeptidasyon adımını etkileyerek bakteriyel hücre çeperinde peptidoglikan öncüllerinin sentezini önlemektedir (Çetinkaya, 2000; Courvalin, 2006). Transglikosilasyon ve transpeptidasyon basamaklarının her ikisi de bakteriyel hücre duvarı çapraz bağlanması için gereklidir (Perichon, 1997; McKessar, 2000; Boyd, 2008).

VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, ve VanG (Perichon, 1997; McKessar, 2000; Boyd, 2008) olmak üzere 6 adet tanınmış vankomisin direnç fenotipi vardır. Bu fenotiplere karşılık gelen gen kümeleri tarif edilmiştir (Boyd, 2008; Xu ve ark., 2010; Lebreton ve ark., 2011).

Vankomisine direnç, plazmidlerle kodlanan vanA ve vanB, kromozomlar tarafından kodlanan vanC, vanD ve vanG genleri ile gelişir (Saba Çopur, 2016).

Enterokoklarda üç tanesi daha sık olmak üzere altı tip glikopeptid direnci tanımlanmıştır. VanA fenotipinde, vankomisin ve teikoplanine indüklenebilir yüksek düzeyli direnç görülmektedir. *VanB* (*vanB1* ve *VanB2*) genleri tarafından kodlanan, VanB fenotipinde vankomisine karşı orta-yüksek şekilde değişen oranlarda indüklenebilen direnç söz konusudur. *vanC* genleri tarafından kodlanan VanC fenotipinde vankomisine düşük düzeyli indüklenemez direnç görülür. Klinik olarak daha sık karşımıza çıkan VanA ve VanB dirençleri, sıklıkla *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında görülmektedirler. VanC direnci ise *E. gallinarum* (*vanC1* genotipi) ve *E. casseliflavus* (*vanC2* ve *vanC3* genotipleri) suşlarının yapısal özelliğidir. Enterokoklar arasında daha nadir olarak vanD, vanE ve vanG genleri tarafından kodlanan üç ek glikopeptid direnci de söz konusudur (Akan, 2009).

## **2.2. Biyofilm**

### **2.2.1. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi**

Uzun zamandır, bakterilerin katı yüzeylere yapışabileceğini ve ince, kaygan bir kat oluşturabileceği bilinmektedir. Bu bakteriyel biyofilmler, doğada bulunan çoğu ıslak yüzeyde yaygındır ve çevresel sorunlara neden olabilir. Pek çok biyofilmin çıplak gözle görülebilmesi için yeterince kalın olması nedeniyle, bu mikrobiyal topluluklar, mikrobiyolojinin ilk araştırılan konuları arasında olmuştur. Anton van Leeuwenhoek plak biyofilmini dişlerinden çıkartarak, bu mikrobiyal topluluğu ilkel mikroskopuyla gözlemlemiştir. 1970'lere gelindiğinde, biyofilm varlığını sürdüren bakterilerin, birçok ortamda bakteriyel biyokütlenin önemli bir bileşenini oluşturduğu anlaşılmıştır (Costerton, 1999). 1980-90'lara gelindiğinde ise bu bakterilerin nasıl organize oldukları da ayrıntılı şekillerde anlaşılmıştır (Lawrence, 1991).

Bakteriyel biyofilmler çevresel sorunlara neden olabileceğinden, yeni uygulamaların geliştirilmesi gerekmektedir. Son zamanlardaki ilerlemeler multidisipliner yaklaşımlarla yapılan çalışmalarla elde edilmiştir (Costerton, 1999).

Mikroorganizmanın; ekstrasellüler polimerik maddeden oluşan bir matriks içerisine geri dönülmez olarak yerleşmesi biyofilm olarak tanımlanabilir (Donlan ve Costerton, 2002).

Bakteriler; diş, akciğer, bağırsak, kontakt lens ve su boruları gibi farklı yüzeylere yapışabilir ve biyofilm oluşturabilirler (Vuong ve ark., 2003). Pek çok bakteriyel türün biyofilm oluşturduğu bilinmektedir. Ayrıca gram-pozitif ve negatif bakteriler ile mayalar aynı biyofilm içerisinde bir arada bulunabilirler (Donlan, 2002). Biyofilmlerdeki bakteriler, ekstrasellüler polimerik bir madde üretmeleri, daha yavaş büyüme oranları ve belirli genlerin varlığı ile serbest yüzen planktonik formlardan ayırt edilebilirler. Hücre dışı polimerik madde, hücreleri antibiyotikler de dahil olmak üzere potansiyel olarak zararlı maddelerden koruma görevi görmektedir (Donlan, 2002).

Biyofilmler, zor bir ortamda hayatta kalmayı sağlayan korumalı bir büyüme şekli oluşturur. Oluşan yapılar, besin maddelerinin dolaşımını sağlayan kanalları içerir ve biyofilmin farklı bölgelerindeki hücreler farklı gen ekspresyonu modelleri sergiler (Davies, 1993; De Beer, 1994). Biyofilm yapısının ve metabolizmanın karmaşıklığı, biyofilmlerin daha yüksek organizmaların dokularına benzemesine yol açmıştır (Costerton ve ark., 1995).

Biyofilmlerin, en az üç mekanizma ile antibiyotik direncine katkıda bulunduğu kabul edilmektedir. Bu mekanizmalar; ekstrasellüler polimerik madde boyunca azaltılmış antibiyotik penetrasyonu, iç katmanlarda elverişli (örneğin anaerobik) bir ortam ve bakteri hücre farklılaşması ve artırılmış koruma sağlamasıdır (Stewart ve Costerton, 2001). Bu açıdan bakıldığında, önemli sayıda kronik bakteriyel enfeksiyonun, geleneksel antibiyotik tedavisi ile kolayca ortadan kaldırılmayan bakteriyel biyofilmleri içerdiği görülmektedir (Costerton, 1999).

Biyofilm geliştiren bakteriler, filmin difüzyona karşı empedansı ve filmdeki elverişli ortam gibi koruyucu özelliklerinden dolayı, planktonik bulunan bakterilerden daha önce antibiyotiklere karşı dirençli hale gelebilmektedirler (Stewart ve Costerton, 2001).

### **2.2.2. Biyofilmin Yapısı**

Biyofilm, polisakkarid bir matriksin bakterinin yüzeyine düzensiz bir şekilde dağılması sonucu oluşur. Biyofilmlerin büyük bölümü (%73-98) hidrate şekildedir. Biyofilmin gelişme potansiyeli; yakın çevredeki besinlerin kullanımı, hücre içine alınımı ve atıklarının uzaklaştırılması ile yakın ilişkilidir (Öztürk ve ark., 2008).

### **2.2.3. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Sebepleri**

Bakterilerin serbest yaşayan ve biyofilm oluşturabilen farklı formları görülebilmektedir. Bakterilerin bazı durumlarda biyofilm oluşturmalarının belli nedenleri vardır. Bunlar; savunma, adezyon ve kolonizasyon, yaşanabilir çevre geliştirmek ve topluluk oluşturmaktır (Öztürk ve ark., 2008).

**Savunma:** Biyofilm oluşturan bakteriler serbest yaşayan bakterilere kıyasla pH değişikliğine, oksijen oranına, besin yokluğuna ve antibiyotiklere karşı daha fazla direnç göstermektedir. Strese karşı oluşan savunma mekanizmasında biyofilmin önemli bir kısmını oluşturan ekzopolisakkaridler (EPS) önemli rol oynamaktadır. EPS, içinde bulunduğu bakteriyi antibiyotik etkisinden ve inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korur (Lewis, 2001; Donlan ve Costerton, 2002). Bakterilerin etrafından aldıkları sinyaller doğrultusunda tehlikenin varlığını algılamaktadırlar. Tehlikenin varlığını algıladıktan sonra yapısında bulunan ya da transfer edilmiş genler tarafından biyofilm oluşturarak, kendileri için daha güvenli şartlar oluşturmaktadırlar (Öztürk ve ark., 2008).

**Adezyon ve Kolonizasyon:** Biyofilm oluşturmak bakterilerin yaşayabilecekleri ortamda kalabilmeleri için en iyi bilinen yöntemdir. Bakteride bulunan yüzey proteinleri, konakçı mikroorganizmaların ekstraselüler matriks proteinine yapışarak; bakterinin konakçıya yapışmasında önemli bir rol almaktadır (Patti ve ark., 1994). Yapışma işlemi gerçekleştikten sonra bakteriler çoğalmaya ve biyofilm özelliği olan bakteriler biyofilm oluşturmaya başlarlar. Biyofilm oluşumu ile bakterinin konakçıya yapışma özelliği artmakta, bununla birlikte bakterinin hareket kabiliyetinde bir baskılama oluşmaktadır (Öztürk ve ark., 2008).

**Yaşanabilir Çevre Geliştirmek:** Bazı bakterilerin yaşadıkları ortamda özellikle glikozun kullanılması biyofilm oluşumunu ve EPS ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Karbon katabolitleri, konakçıya yapışmış olan bakterinin biyofilm oluşturma genlerine sinyal göndererek; biyofilmin oluşumunda önemli bir yer almaktadır (O'Toole ve ark. 2000; Jefferson ve ark. 2004).



Topluluk Oluşturmak: Bakteriyel biyofilm de, kazançların ortak paylaşımı ve ortama adaptasyonundaki beraberlik sıklıkla görülmektedir. Ayrıca bakteriler besin, pH, ısı gibi ortamdan aldıkları uyaranlarla biyofilmden serbest hale geçebilmektedirler. Biyofilm içindeki bakterilerin çevre faktörlerine benzer yanıt vermiş olmaları toplu halde bulunmalarının önemli bir göstergesidir (Öztürk ve ark.2008).

#### **2.2.4. Biyofilm Oluşum Basamakları**

Biyofilm oluşturacak bakteri yüzeye yaklaşır ve hareketleri yavaşlamaya başlar. Daha sonra yüzeye ve/veya daha önce yüzeye eklenmiş diğer mikroorganizmalarla geçici bir bağlantı oluşturabilirler. Bu geçici ilişki, yerleşmek için bir yer aramasına izin verir. Bakteri, bir mikrokolonun üyesi olarak kalıcı bir birliktelik oluşturduğunda, yaşayacağı alanı seçmiş ve tutunma işlemi gerçekleşmiş olur (Miller ve Bassler, 2001).

Tutunma işleminden sonra geri dönüşümsüz tutunma işlemi vardır. Bakterilerin bir yüzeye ilk taşınması ve geri dönüşümsüz şekilde bağlanması, hareketli bakterilerle aktif hareket veya bakteriyel hücre yüzeyi ile substratum arasındaki elektrostatik ve fiziksel etkileşimler yoluyla konveksiyon akımları ile meydana gelebilir (Van Loosdrecht ve ark., 1990; Busscher ve ark., 1995). Kolonizasyon aşamasında ise bağlı bakteriler büyür ve bölünürler. Daha sonra biyofilmin temel organizasyonel birimleri olarak kabul edilen mikrokolonları oluşturur (Costerton ve ark., 1994).

EPS'deki diğer planktonik hücrelerin tutulması biyofilm oluşumuyla sonuçlanır. Bir yüzeye bir bakterinin, yani birincil kolonizerlerin kolonizasyonu, diğerlerinin aynı yüzeye, sekonder kolonizerlerin, bağlanmasını da sıklıkla etkiler (Van Loosdrecht ve ark. 1990; Flemming ve ark., 1998).

Son olarak kopma ve ayrılma aşaması vardır. Bu aşamada, biyofilm oluştuktan sonra üst kısımda bulunan bakterilerde kopmalar meydana gelir (Lindsay ve Holy, 2006).

Biyofilm üretimi, çeşitli bakteriyel patojenlerde çoğunluğu algılama (quorum sensing) sistemleri tarafından düzenlenir (Muhomed ve Huang, 2007). Quorum sensing aynı zamanda bakteriler arasındaki haberleşmeyi de sağlamaktadır (Lindsay ve Holy, 2006).

### **2.2.5. Biyofilm Hastalık İlişkisi**

Epidemiyolojik kanıtlardan, biyofilmlerin hem kistik fibrozis ve periodontitis gibi spesifik durumlar hem de kalıcı tıbbi cihazların bir sonucu olarak kan dolaşımı ve idrar yolu enfeksiyonları gibi bulaşıcı hastalıklarda rolü olduğu görülmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar bu süreç için daha uygun olabilmektedir. Bununla birlikte, biyofilm üreten organizmaların hastalığa neden olduğu süreçler kesin olarak anlaşılamamıştır. Ancak, kalıcı tıbbi cihaz biyofilmlerinden hücrelerin veya hücre agregatlarının ayrılması, kan akımı veya idrar yolu enfeksiyonları ile sonuçlanması, endotoksin üretimi, konakçı bağışıklık sistemine karşı direnç ve dirençli organizmaların üretimi için bir ortamın sağlanması (dirençli plazmid değişimi ile) hastalık sürecine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Donlan, 2002).

### **Hücrelerin veya Hücre Agregalarının Ayrılması**

Hücreler, büyüme ve bölünme sonucu biyofilmlerden ayrılabilirler. Ayrıca hücre kümeleri, biyofilmden kopup ayrılabilirler. Bu kopmaların nedenleri tam anlaşılamamakla birlikte akış yönündeki ve substrat konsantrasyonundaki değişikliklerle ilgili olabileceği düşünülmektedir (Characklis ve ark., 1990; Donlan ve Costerton, 2002). Davies ve ark. (1998), aynı zamanda, açıl-homoserin lakton moleküllerinin hem biyofilm mimarisine hem de dekolmana aracı olabileceğini göstermiştir (Davies ve ark., 1998).

### **Endotoksinlerin Üretimi**

Kalıcı tıbbi cihazların biyofilmleri içindeki gram-negatif bakteriler, endotoksinler üreterek hastada bir bağışıklık tepkisi oluşturabilmektedir. Çeşitli çalışmalar, biyofilmlerin endotoksin düzeylerini ölçmüştür (Vincent, 1989; Rioufol, 1999; Holland, 2000).

### **Konak Bağışıklık Sistemine Direnç**

Meluleni ve ark. (1995), kronik kistik fibrozlu hastalar tarafından üretilen opsonik antikorların, fagositoza aracılık etmede ve biyofilm mikrokolonilerinde büyüyen bakteriyel hücrelerin eliminasyonunda etkisiz olduğunu göstermiştir (Meluleni ve ark., 1995). Buna bağlı olarak biyofilmde bulunan organizmaların, enfeksiyona neden olabilmek için bağışıklık sistemini daha kolay aşabileceği sonucuna varılabilmektedir (Donlan, 2002).

### **Dayanıklı Organizmaların Üretimi İçin Bir Ortam Sağlanması**

Bakterilerin biyo-filmler içinde konjügasyon yoluyla plazmidleri değiştirebildiği ve direnç faktörlerinin bir plazmid üzerinde taşınabileceği gösterilmiştir (Donlan, 2002).

#### **2.2.6. Quorum Sensing**

Çoğunluğu algılama (Quorum sensing), grup davranışını düzenlemeye yardımcı olan bir bakteri iletişim şeklidir. Bakteriler çevreye oto-indüktör olarak adlandırılan kimyasal maddeler salgılamaktadır. Bakteri sayısı arttıkça, oto-indükleyici konsantrasyonu da artmaktadır. Bu sayı yeterince yüksek olduğunda (oto-indükleyici konsantrasyon) kaynak veya yakın bakteriler üzerinde reseptörlere bağlanacak kadar yüksek hale gelir. Sinyal daha sonra hedef bakterilerde hücre içi biyokimyasal bir sinyale veya değiştirilmiş gen ifadesine dönüştürülür. Bu biyoluminesans, biyofilm oluşumunun aktivasyonu gibi çeşitli adaptif fizyolojik değişiklikleri uyarabilir (Miller ve Bassler, 2001; Dunn ve Handelsman, 2002).

#### **2.2.7. Biyofilmde Antimikrobiyal Direnç**

Doğal ve endüstriyel ortamlarda büyüyen biyo-filmler, endüstriyel süreçlerde biyolojik kirliliğe karşı mücadele etmek için kullanılan, çeşitli biyosidlere karşı dirençlidir (Brown ve Gilbert, 1993). Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direnç mekanizması, maddenin biyofilme derinlemesine nüfuz edememesidir. Biyofilm matrisini oluşturan polimerik maddelerin, antibiyotiklerin difüzyonunu geciktirdiği bilinmektedir. Genel olarak çözünenlerde, biyo-filmler içindeki sularda, olduğundan daha düşük oranlarda yayılmaktadır (Cheema, 1986; Gordon ve ark., 1988; Nichols ve ark., 1988; Bolister ve ark., 1991; Kumon ve ark., 1994; Ishida ve ark., 1998; Stewart, 1998).

Biyofilm içinde bulunan bakterilerin, bazı durumlarda planktonik organizmaları tamamen ortadan kaldırmak için yeterli miktarda antibiyotik dozuna dayanabildiği gösterilmiştir (Nickel ve ark., 1985; Anwar ve ark., 1989; Nickel ve Costerton, 1991; Anwar ve ark., 1992). Biyofilm ortamının bakterilere antibiyotik nüfuz oranını düşürmesi, bakterilerin antibiyotik indirgeyici enzimlerin ekspresyonu için yeterli zaman sağlayabilmektedir (Suci ve ark., 1994).

### **2.2.8. Enterococcus Türleri ve Biyofilm**

Enterokoklar, cihazla ilişkili enfeksiyonlarda önemli rol oynayan, biyofilm oluşturma yetenekleri ile bilinmektedirler (Tande ve Patel, 2014; Hashem ve ark., 2017). Enterokokal biyofilmlere karşı ampisilin, linezolid ve vankomisin minimum biyofilm bakterisidal konsantrasyon (MBBK) değerleri, planktonik MİK değerlerinden 1000 kat daha yüksek olabilmektedir. Biyofilmlere karşı aktif olan konsantrasyonlar, klinik olarak kabul edilebilir insan serum düzeylerinin üzerindedir (Sandoe ve ark., 2006).

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. MATERYAL**

##### **3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatlar**

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 15.09.2017 tarihinde B.30.2.ODM.0.20.08/1140 sayılı izni ile yürütülmüştür (Ek-1). Çalışmaya Haziran 2016 - Haziran 2017 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli servislerden gönderilen, kan kültür örneklerinde izole edilen toplam 170 *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları dahil edilmiştir. Kontrol suşu olarak biyofilm oluşturmeyen *E. coli* ATCC 25922 ve biyofilm oluşturan *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 kullanıldı.

#### **3.2. METOT**

##### **3.2.1. Bakterilerin Tanımlanması**

Çalışmaya dahil edilen izolatların tanımlanması mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerin rutin tanımlama işlemleri ile yapıldı. Bu işlemler rutin mikrobiyoloji laboratuvarında şu sıraya göre yapılmıştır; kan kültürü şişelerinde alınan üreme sinyali ile örnekler %5 koyun kanlı agar (bioMérieux, Fransa) ve EMB (bioMérieux, Fransa) agara ekildi; ekimi yapılan besiyerleri 35<sup>0</sup>C de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı; inkübasyon işleminin sonucunda üreyen bakteriler değerlendirmeye alındı. Üremiş olan kolonilerden enterokokların tanımlanma işlemi için gram pozitif, hareketsiz, aerobik veya fakültatif aerob, katalaz negatif, genelde diplokok veya kısa zincir oluşturma özellikleri değerlendirildi. Tür düzeyinde tanımlanma işlemi Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılarak yapıldı.

##### **3.2.2. Antimikrobiyal Direncinin Belirlenmesi**

Çalışmada kullanılan suşların vankomisin direnci ilk olarak Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) sistemiyle rutin olarak belirlendi ve daha sonra disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal direnç durumu doğrulandı.

### 3.2.3. Vitek 2 Compact Otomatize Sistemi

Enterokoklar için antibiyotik duyarlılığı AST640 kartı kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda Vitek 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sisteminde çalışıldı. Bunun için izolatlar %5 koyun kanlı besiyerinde üretildi ve sonra 0.5 MacFarland bulanıklığa ayarlanarak çalışmaya alındı. Otomatize sistemden alınan vankomisin duyarlılık sonuçları disk difüzyon yöntemi ile doğrulandı.

### 3.2.4. Disk Difüzyon Yöntemi

Enterokokların vankomisine duyarlılığı Kirby–Bauer disk difüzyon yöntemi ile EUCAST tarafından verilen öneriler doğrultusunda yapıldı. Bu yöntem için steril olan petrilere Muller Hinton Agar (MHA) besiyeri döküldü ve kullanılabildiği kadar +4°C’ de saklandı. Araştırılacak olan klinik izolatlar saf düşecek şekilde kanlı agar besiyerine ekildi. Saf olarak üreyen suşlar steril bir eküvyon yardımıyla alınarak serum fizyolojik içeren tüplere 0.5 MacFarland bulanıklık olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanmış olan bu tüplerden steril bir eküvyon yardımıyla alınarak MHA besiyerine yayma ekim yapıldı. Ekim işleminden sonra vankomisin diskleri MHA besiyerine yerleştirildi ve 36°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. Bir gece sonra diskin etrafında oluşan zon çapları ölçüldü. Elde edilen sonuçları EUCAST’ın önerdiği zon çapları ile karşılaştırarak değerlendirildi. Tablo 3’de EUCAST’da enterokoklar için vankomisin zon çaplarının sınır değerleri görülmektedir.

**Tablo 3.** EUCAST’a göre Enterokoklarda vankomisin zon çapları

Antibiyotik	Duyarlı (S)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)
Vankomisin (30µg)	≤14	15-16	≥17

### 3.2.5. Biyofilm Varlığının Araştırılması

Enterokoklarda biyofilm varlığının fenotipik olarak araştırılması için tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plak yönetimi kullanıldı.

### 3.2.6. Tüp Yöntemi

Tüp yöntemiyle biyofilm araştırması için %0,25 glukoz içeren Triptikaz Soy Buyyon (TSB) besiyeri steril olarak hazırlandı. Hazırlanan besiyeri önceden steril edilen cam tüplere 5’er ml konuldu. Daha sonra, kanlı agar da taze üretilmiş olan izolattan birkaç koloni alınarak 5 ml’lik TSB içeren tüplere inoküle edildi.

Tüpler 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda cam tüplerin iç yüzeyine pipetle temas etmeden tüm besiyeri aspire edildi. Boşaltılmış olan tüpün içerisine 1'er ml %25'lik safranin eklendi. Safranini ekledikten sonra tüm iç yüzeyin boyanması için tüpün ağzı kapatıldı ve hafifçe çevrildi. Tüm yüzey boya ile temas ettikten sonra tüpün iç yüzeyinde bir film tabakasının oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bu kontrol sonucunda tüpün iç yüzeyinde bir film tabakasının varlığı şu şekilde değerlendirildi:

Duvarda hiç boyanma yok:	Negatif
Tüpün yan kısmında çok hafif boyanma :	+1
Tüpün yan kısmında hafif boyanma :	+2
Tüpün duvarları boyunca yoğun boyanma:	+3

Bu derecelendirme sonucunda negatif ve +1 sonucu tüp yöntemi negatif, +2 ve +3 sonucu ise tüp yöntemi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Ayrıca, sadece besiyerinin hava ile temas eden kısmında halka şeklinde bir şerit oluşması da negatif olarak değerlendirildi (Bektöre, 2014).

### 3.2.7. Mikrotitrasyon Plak Yöntemi

Enterokok suşları saf olacak şekilde kanlı agara pasajlandı. Pasajlanan enterokoklar %0,25 glukoz içeren TSB besiyerine ekilerek 36°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra kültürler 1/20 dilüe edilerek; her kuyucuğa 200 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağının içerisine konuldu. Bu şekilde 36°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi. Aspirasyon işleminden sonra 3 kez distile su ile nazikçe yıkandı ve ters çevrilip kurutuldu. Kuyucuklara hazırlanan %1'lik kristal viyole solüsyonundan 100'er µl dağıtıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Boyama işleminden sonra plak 3 kez distile su ile yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Üzerine boyayı çözmek için hazırlanan etanol/aseton (80:20) solüsyonundan 200'er µl dağıtıldı. 10 dakika boyanın çözülmesi beklendi. Bu işlemden sonra plaklar 492 nm dalga boyunda ELISA (ChroMate, Amerika) okuyucuda okutuldu (Christensen ve ark., 1985; Milletli Sezgin, 2012).

Mikrotitrasyon plak yöntemiyle her izolat 3 kez çalışıldı. Bu yöntemde negatif kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922 ve pozitif kontrol olarak *A. baumannii* ATCC 19606 kullanıldı. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrol izolatlarının optik dansite değerlerine göre yorumlanarak değerlendirildi (Us, 2006; Milletli Sezgin, 2012).

### 3.2.8. Moleküler Yöntemler

#### Enterokok İzolatlarında DNA Ekstraksiyonu

Enterokok suşlarına kaynatma yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldı. MHA besiyerine ekilen bakteriler 20-22 saat 36°C’de inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon işleminden sonra üremiş olan bakterilerden bir öze dolusu alınarak; içerisinde 500 µl distile su bulunan mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Vorteks işlemi yapılarak bakterinin süspanse olması sağlandı. İşleminin ardından homojen hala gelen süspanسیون 15 dakika 100°C’ye ayarlanmış olan kuru bloğa yerleştirildi. Kuru bloktan çıktıktan sonra mikrosantrifüj tüpleri santrifüj cihazına yerleştirilip; 15000xg’de, 4°C’de 20 dakika santrifüj işlemi uygulandı. İşlem bittikten sonra süpernatant daha sonra PZR işleminde kullanılabilmek için mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Elde edilen DNA’lar kullanılmaya kadar -20°C ‘de saklandı (Baylan ve ark., 2011).

#### *Esp* geninin standart PZR yöntemi ile araştırılması

*Esp* gen bölgesi standart PZR işlemi ile test edildi.

#### Kullanılan Primerler

*Esp* geninin belirlenebilmesi için 954bp’lik bölgeyi çoğaltan *esp11* ve *esp12* primerleri kullanılmıştır (Shankar ve ark., 1999). Primerlerin baz dizileri Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** *Esp* geninin belirlenmesinde kullanılan *esp11* ve *esp12* primerlerinin baz dizileri

Gen	Primer Adı	Primer Dizisi (5’ – 3’)	Boyut (bp)
<i>esp</i>	Esp11	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	954
	Esp12	GCGTCAACACTTGCAATGCCGAA	

PZR reaksiyon içeriği Shankar ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları miktarlara göre hazırlandı (Shankar ve ark., 1999). PZR reaksiyon içeriği Tablo 5’da görülmektedir.



**Tablo 5.** *Esp* geni için PZR reaksiyon karışımı

<b>Malzeme</b>	<b>Miktar (µl)</b>
10X PZR tampon	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
dNTP karışımı (10 mM)	0,5
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,5
Primer - F (10 pmol)	0,25
Primer - R (10pmol)	0,25
Kalıp DNA	3
Safsu	15,5
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

PZR işlemi için Shankar ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları amplifikasyon programı modifiye edilerek kullanıldı (Shankar ve ark., 1999). PZR işlemi için kullanılan amplifikasyon programı Tablo 6’de verilmiştir.

**Tablo 6.** *Esp* geni için PZR amplifikasyon programı.

<b>Aşama</b>	<b>Gen Bölgesi</b>	<b><i>Esp</i></b>		<b>Döngü Sayısı</b>
		<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre</b>	
Ön Denatürasyon		95	2 dk	1
Hedef DNA denatürasyonu		94	45 sn	
Primer bağlanması		54	45 sn	30
Primer uzaması		72	4 dk	
Son uzama		72	5 dk	1

Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra ürünler 1X'lik TBE (Trish-Borik asit-EDTA) tamponu ile hazırlanan %1.5'lik agaroz jelde (Biomax), 120V'da, 1 saat süre ile yine aynı tampon içinde elektroforez işlemine tabii tutuldu. İşlem sonunda jeller 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren distile suda 20 dk süreyle orbital karıştırıcıda bekletildi. Süre sonunda jeller UV ışık (Bio-rad) altında bantların varlığı yönünden incelendi ve görüntü kaydedilerek saklandı.

Elektroforez sonucu pozitif olduğu görülen anplikonlardan örnek olarak seçilen bir ürüne, sekans işlemi uygulandı (Sentebiolab, Türkiye).

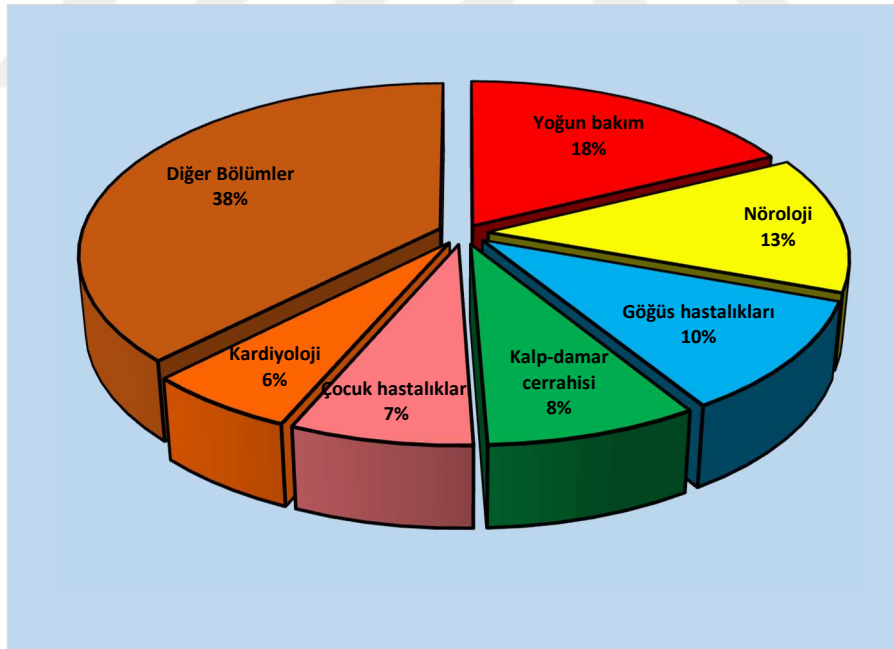
### **3.2.9. İstatistiksel Analiz**

Veriler IBM SPSS V23 ile analiz edildi. Türlerine göre yöntem sonuçlarının karşılaştırılmasında Pearson Kikare testi kullanıldı. Önem düzeyi  $p < 0,05$  olarak alındı.

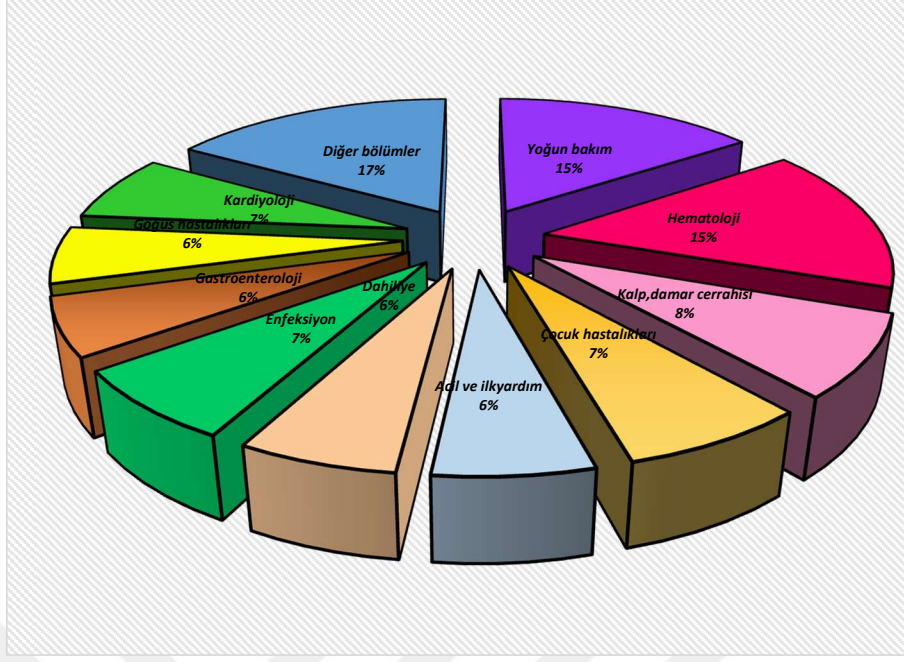
#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda kan kültür şişelerinden izole edilen 170 enterokok suşu kullanıldı. Çalışmada kullanılan 85 *E. faecalis* suşunda 3 tanesi katater 1.lümen (%3,5), 1 tanesi katater 2.lümen (%1,2), 7 tanesi katater hub'ından kan (%8,2), 9 tanesi periferik ven'den kan (%10,6), 65 tanesi tam kan (%76,5); 85 *E. faecium* suşundan 2 tanesi katater 1.lümen (%2,35), 2 tanesi katater 2.lümen (%2,35), 3 tanesi katater hub'ından kan (%3,5), 10 tanesi periferik ven'den kan (%11,8) ve 68 tanesi tam kan (%80) örneklerinden izole edildi.

Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* izolatları en sık (%17,6) yoğun bakım servisinde, en az (%1,2) ise beyin cerrahi ve dermatoloji servislerinden izole edildi. *E. faecium* izolatları ise en çok (%15,3) yoğun bakım ve hematoloji servislerinden, en az (%1,2) ise göğüs cerrahi, nefroloji ve plastik ve estetik cerrahi bölümlerinden izole edilmişlerdir. *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının üretildiği materyallerin gönderildiği servislerin dağılımı Şekil 1 ve 2'de grafiklerle gösterilmektedir.



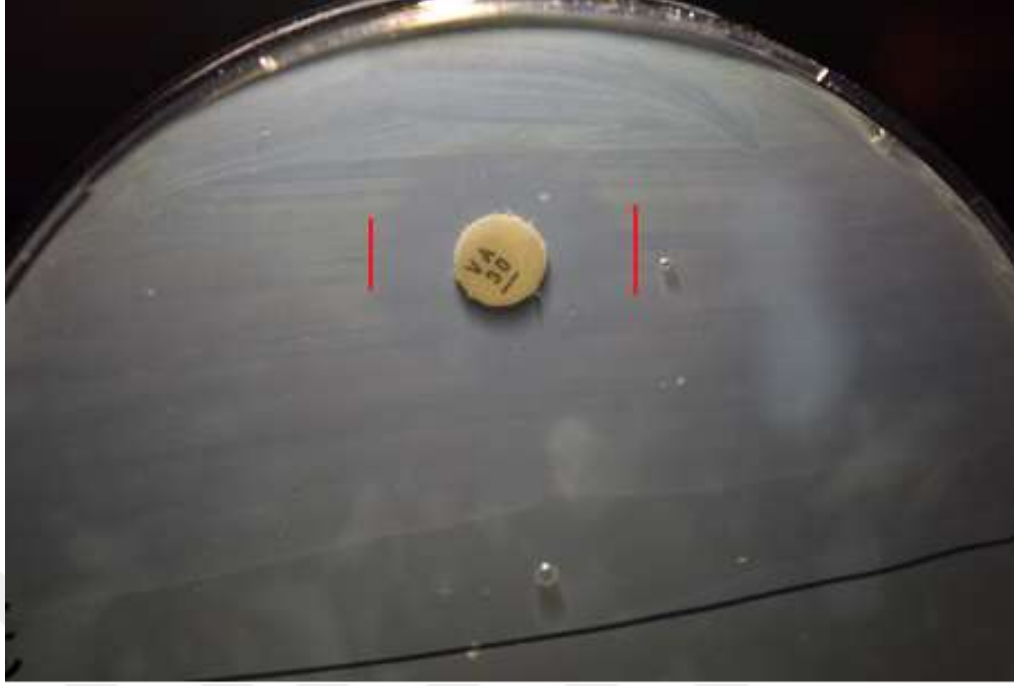
**Şekil 1.** *E. faecalis* türünün izole edildiği servislerin dağılım grafisi (Diğer bölümler: acil ve ilkyardım, beyin cerrahi, dahiliye, dermatoloji, enfeksiyon, gastroenteroloji, genel cerrahi, hematoloji, onkoloji, nefroloji ve üroloji)



**Şekil 2.** *E. faecium* türünün izole edildiği servislerin dağılım grafisi (Diğer bölümler: beyin cerrahi, göğüs cerrahi, genel cerrahi, onkoloji, nefroloji, nöroloji, plastik ve estetik cerrahi)

#### 4.1. Vankomisin dirençli

Çalışmaya dahil edilen 85 *E. faecalis* izolatının vankomisin duyarlılıklarının; 70 tanesi (%82,3) duyarlı, 14 tanesi (%16,5) orta duyarlı, 1 tanesi (%1,2) dirençli olduğu görüldü. 85 *E. faecium* izolatının ise 56 tanesi (%65,9) duyarlı, 29 tanesi (%34,1) dirençli olduğu görülmüştür. Disk difüzyon yöntemiyle vankomisin duyarlılığının belirlenmesi örneği Şekil 3’de görülmektedir.



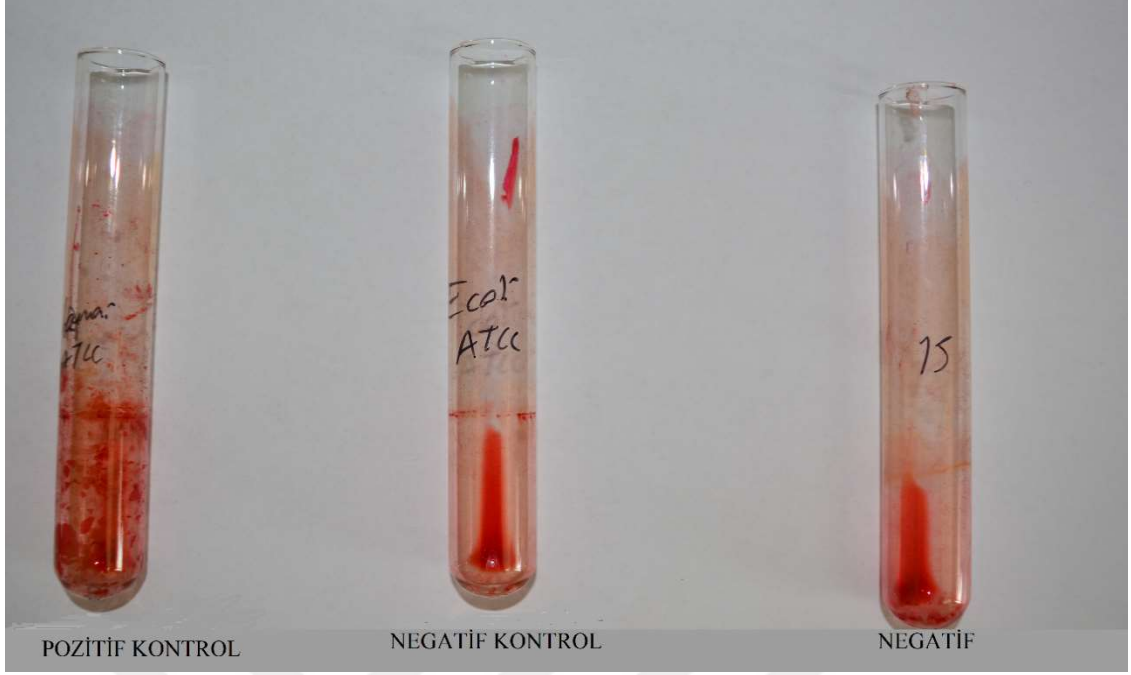
**Şekil 3.** Disk difüzyon yöntemiyle vankomisin duyarlılığının belirlenmesi

Tüp yöntemi sonucu pozitif çıkan 5 suştan 4 tanesi (%80) vankomisin duyarlı, 1 tanesi (%20) orta duyarlı bulunmuştur. Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucu pozitif çıkan 27 suştan ise 21 tanesi (%77,8) vankomisin duyarlı, 6 tanesi (%22,2) orta duyarlı bulunmuştur.

#### **4.2. Fenotipik Testlerin Biyofilm Sonuçları**

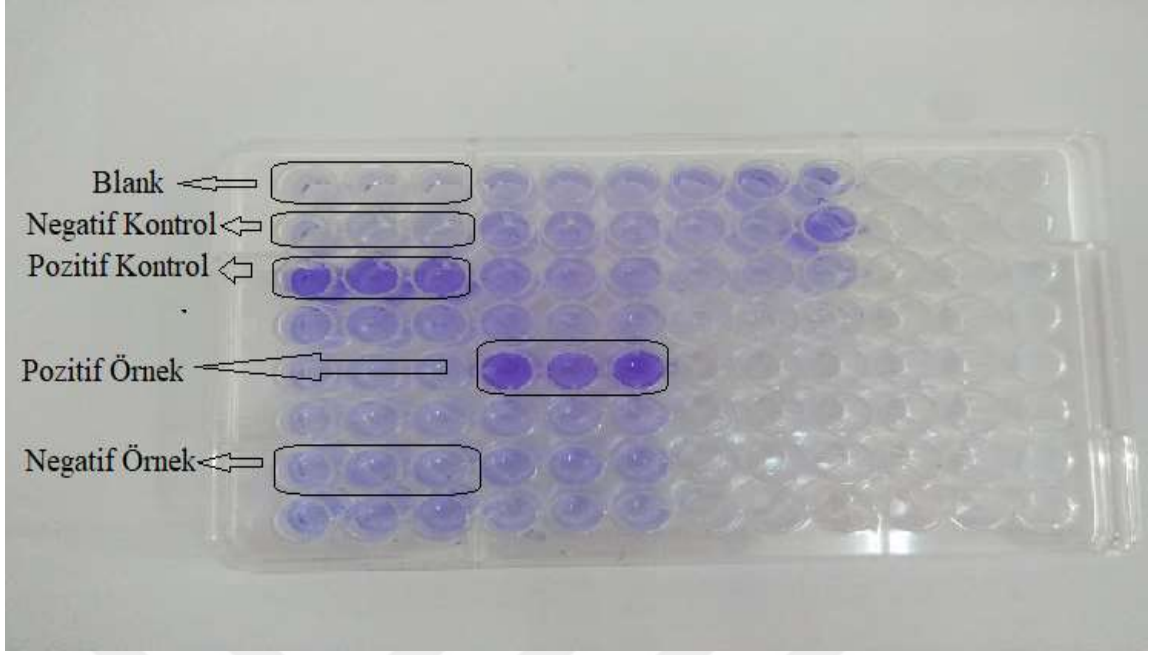
Çalışmamızda kullanılan izolatların biyofilm oluşumu fenotipik olarak tüp ve mikrotitrasyon plak yöntemiyle incelendi.

Tüp yöntemi çalışılan 85 *E. faecalis* izolatının yalnızca 5 tanesinin (%5,9) biyofilm oluşturduğu görüldü. 5 suştan 1 tanesinde +3 değeri ile pozitif olduğu görülürken; kalan 4 izolatın +2 pozitiflik değeri aldığı görüldü. Çalışılan 85 *E. faecium* izolatının hiç birinde tüp yöntemiyle biyofilm üretimi saptanamamıştır. Tüp yöntemi ile biyofilm üretiminin araştırılması örneği Şekil 4’de görülmektedir.



**Şekil 4.** Tüp yöntemi ile biyofilm üretiminin değerlendirilmesi

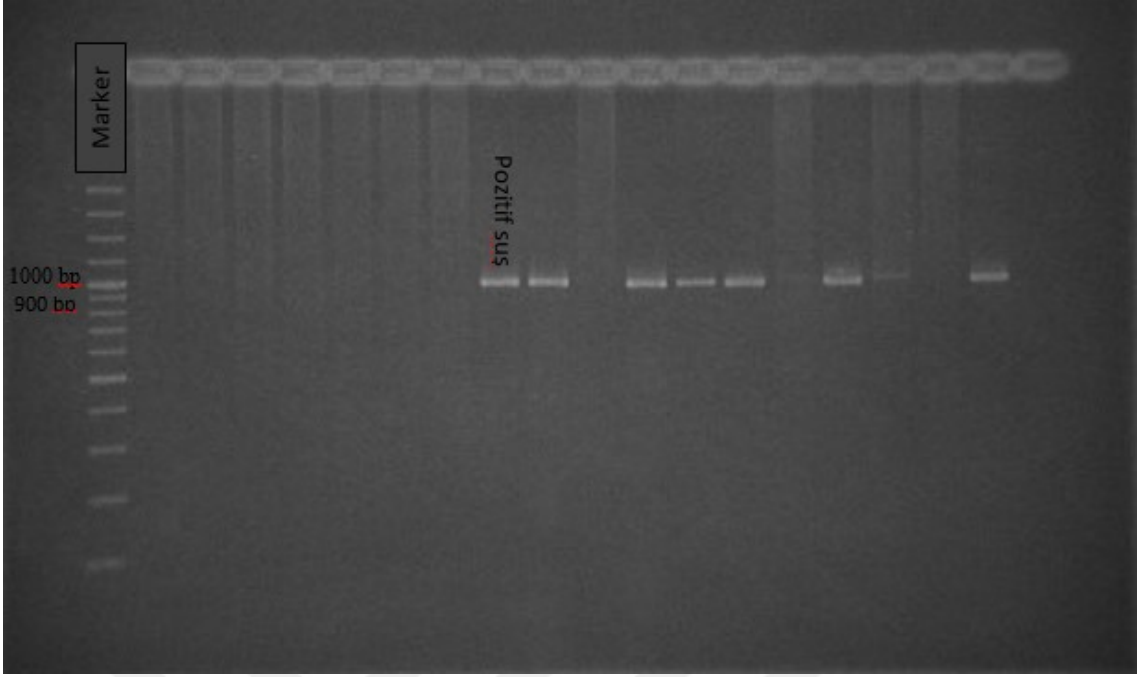
Mikrotitrasyon plak yöntemi çalışılan 85 *E. faecalis* izolatının 27 tanesinin (%31,8) biyofilm oluşturduğu görüldü. Çalışılan 85 *E. faecium* izolatının hiç birinde Mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm üretimi saptanamamıştır. Mikrotitrasyon plak yöntemiyle biyofilm üretiminin araştırılması örneği Şekil 5’de gösterilmiştir.



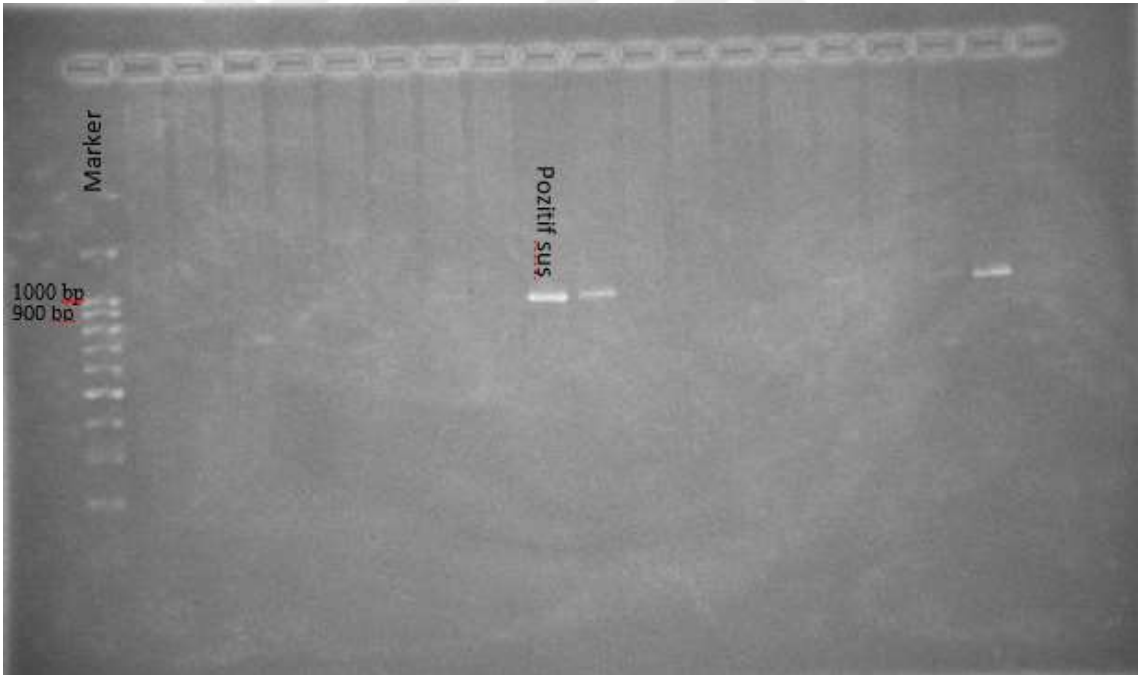
Şekil 5. Mikrotitrasyon plak yöntemiyle biyofilm üretiminin değerlendirilmesi

#### 4.3. *esp* varlığının PZR 'ile tespiti

PZR işleminin sonucunda 85 *E. faecalis* suşunun 49 tanesi (%57,6); 85 *E. faecium* suşunun 20 tanesi (%23,5) *esp* varlığı yönünden pozitif olarak bulunmuştur. Fenotipik yöntemler ile genotipik yöntem karşılaştırıldığında mikrotitrasyon plak yönteminde pozitif olan izolatlardan 24 tanesinde, tüp yönteminde pozitif olan izolatlardan ise 5 tanesinde *esp* geninin varlığı tespit edilmiştir. Vankomisin duyarlılık sonuçlarıyla, PZR sonuçları karşılaştırıldığında; *esp* pozitif bulunan 49 *E. faecalis* izolatının 43'ü duyarlı, 5'i orta duyarlı, 1'i dirençli; 20 *E. faecium* izolatında ise 9'u duyarlı ve 11'i dirençli olarak bulunmuştur. *E. faecalis* ve *E. faecium* için örnek jel görüntüleri Şekil 6 ve 7'de görülmektedir.



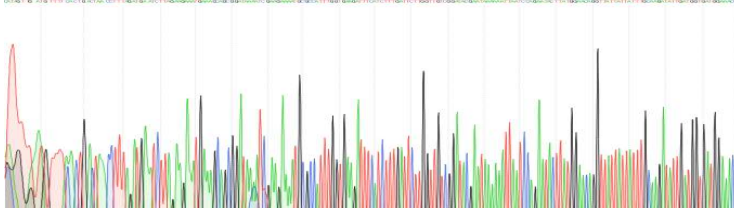
Şekil 6. *E. faecalis* için örnek jel görüntüsü



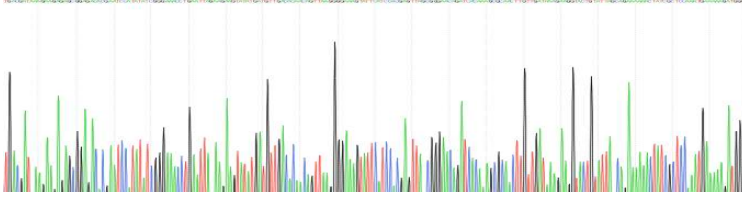
Şekil 7. *E. faecium* için örnek jel görüntüsü

Sekans işlemi uygulanan *esp* pozitif örnek izolatın dizisi değerlendirildiğinde *esp* bölgesine uyumlu olduğu görülmüştür. Sekans işleminin sonuçları Şekil 8, 9, 10, 11, 12’de görülmektedir.

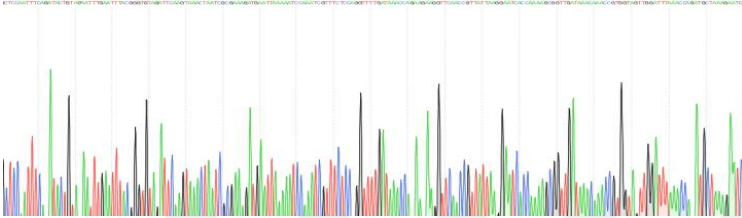




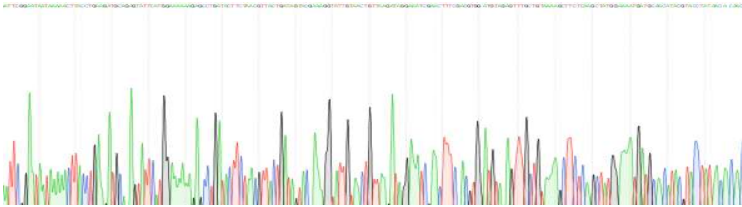
**Şekil 8.** Sekans işlemi sonuç görüntüsü (1-200bp)



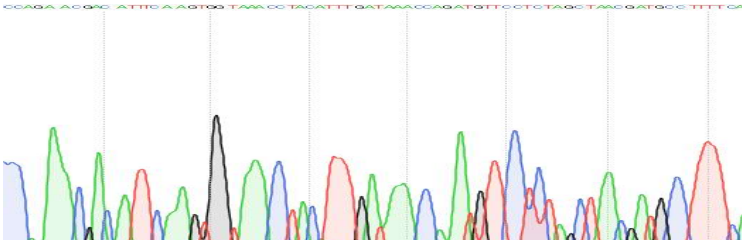
**Şekil 9.** Sekans işlemi sonuç görüntüsü (201-400bp)



**Şekil 10.** Sekans işlemi sonuç görüntüsü (401-600bp)



**Şekil 11.** Sekans işlemi sonuç görüntüsü (601-800bp)



**Şekil 12.** Sekans işlemi sonuç görüntüsü(801-1000bp)

*E. faecalis* ve *E. faecium* için disk difüzyon, tüp biyofilm oluşturma, mikrotitrasyon plak yöntemi ve *esp* varlığının analiz sonuçları Tablo 7’de sunulmaktadır.

**Tablo 7.** *E. faecalis* ve *E. faecium* türünün fenotipik ve genotipik yöntemlerle istatistiksel değerleri

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	P
<b>Vankomisin Direnci n (%)</b>	1 (1,2)	29 (34,1)	<0,001
<b>Tüp Biyofilm Yöntemi n (%)</b>	5 (5,9)	0	0,023
<b>Mikrotitrasyon Plak Yöntemi n (%)</b>	27 (31,8)	0	<0,001
<b>PZR ile <i>esp</i> varlığı n (%)</b>	49 (57,6)	20 (23,5)	<0,001

Çalışmanın sonunda her bir izolat için elde edilen disk difüzyon, tüp biyofilm oluşturma, mikrotitrasyon plak yöntemi ve PZR ile *esp* varlığının bakılması sonuçları toplu olarak Tablo 8’de sunulmaktadır.

**Tablo 8.** Tüm izolatlar için tüm testlerin toplu sonuçları

Örnek No	Disk Difüzyon	Tüp Biofilm Oluşumu	Mikrotitrasyon Plak	PZR ( <i>Esp</i> )
1.	S	-	-	+
2.	S	-	-	-
3.	S	-	-	-
4.	S	-	-	+
5.	I	-	-	-
6.	S	-	-	-
7.	S	-	-	+
8.	S	-	-	+
9.	R	-	-	+
10.	S	-	-	-
11.	I	-	-	-
12.	S	-	-	-
13.	S	-	+	+
14.	S	-	-	-
15.	S	-	-	+
16.	S	-	-	+
17.	S	-	-	-
18.	I	-	+	+
19.	S	-	-	-
20.	S	-	-	+
21.	S	-	+	+
22.	I	-	+	+
23.	S	-	-	-
24.	S	-	-	+
25.	S	-	-	-
26.	I	-	-	-
27.	S	-	+	+
28.	S	-	-	+
29.	S	-	-	-
30.	S	-	+	+
31.	S	-	-	-
32.	S	-	-	-
33.	S	-	-	-
34.	S	+++	+	+
35.	S	-	+	+
36.	S	-	-	+
37.	S	-	-	+
38.	S	++	+	+

**Tablo 8.** Tüm izolatlar için tüm testlerin toplu sonuçları (Devamı)

Örnek No	Disk Difüzyon	Tüp Biofilm Oluşumu	Mikrotitrasyon Plak	PZR ( <i>Esp</i> )
39.	S	-	-	+
40.	S	-	-	+
41.	I	-	-	+
42.	S	-	+	+
43.	S	-	-	-
44.	I	-	-	-
45.	S	-	+	+
46.	S	-	+	+
47.	S	-	+	+
48.	S	-	+	+
49.	S	-	+	-
50.	S	-	-	-
51.	I	-	-	-
52.	I	-	+	-
53.	S	-	-	-
54.	I	-	+	-
55.	I	-	+	+
56.	S	-	-	-
57.	S	-	+	+
58.	S	-	-	-
59.	I	-	-	-
60.	S	-	-	-
61.	I	++	+	+
62.	I	+	-	-
63.	S	-	-	-
64.	S	-	-	-
65.	S	-	-	-
66.	S	-	+	+
67.	S	++	+	+
68.	S	-	-	-
69.	S	-	-	+
70.	S	-	-	+
71.	S	-	+	+
72.	S	-	-	+
73.	S	-	-	+
74.	S	-	-	+
75.	S	-	-	+
76.	S	-	+	+
77.	S	-	+	+
78.	S	-	-	+

**Tablo 8.** Tüm izolatlar için tüm testlerin toplu sonuçları (Devamı)

Örnek No	Disk Difüzyon	Tüp Biofilm Oluşumu	Mikrotitrasyon Plak	PZR ( <i>Esp</i> )
79.	S	-	-	-
80.	S	++	+	+
81.	S	-	-	+
82.	S	-	-	-
83.	S	-	-	+
84.	S	-	+	+
85.	S	-	-	+
86.	S	-	-	-
87.	R	-	-	-
88.	S	-	-	-
89.	R	-	-	-
90.	R	-	-	-
91.	S	-	-	-
92.	S	-	-	-
93.	R	-	-	-
94.	R	-	-	-
95.	S	-	-	-
96.	S	-	-	-
97.	R	-	-	-
98.	R	-	-	-
99.	S	-	-	-
100.	S	-	-	-
101.	S	-	-	-
102.	S	-	-	-
103.	R	-	-	-
104.	S	-	-	-
105.	R	-	-	-
106.	R	-	-	-
107.	R	-	-	+
108.	R	-	-	+
109.	S	-	-	+
110.	R	-	-	+
111.	S	-	-	+
112.	S	-	-	-
113.	R	-	-	-
114.	S	-	-	-
115.	S	-	-	-
116.	R	-	-	+
117.	S	-	-	-
118.	S	-	-	-

**Tablo 8.** Tüm izolatlar için tüm testlerin toplu sonuçları (Devamı)

Örnek No	Disk Difüzyon	Tüp Biofilm Oluşumu	Mikrotitrasyon Plak	PZR ( <i>Esp</i> )
119.	S	-	-	-
120.	S	-	-	-
121.	S	-	-	-
122.	S	-	-	-
123.	R	-	-	-
124.	S	-	-	-
125.	S	-	-	-
126.	S	-	-	-
127.	S	-	-	-
128.	S	-	-	+
129.	S	-	-	-
130.	R	-	-	+
131.	S	-	-	-
132.	S	-	-	-
133.	S	-	-	-
134.	S	-	-	-
135.	S	-	-	-
136.	S	-	-	-
137.	S	-	-	-
138.	S	-	-	-
139.	R	-	-	+
140.	R	-	-	-
141.	R	-	-	+
142.	S	-	-	-
143.	R	-	-	-
144.	S	-	-	-
145.	S	-	-	-
146.	S	-	-	-
147.	S	-	-	-
148.	S	-	-	+
149.	R	-	-	-
150.	S	-	-	+
151.	R	-	-	+
152.	S	-	-	-
153.	R	-	-	-
154.	S	-	-	-
155.	S	-	-	-
156.	S	-	-	+
157.	S	-	-	-
158.	S	-	-	+

**Tablo 8.** Tüm izolatlar için tüm testlerin toplu sonuçları (Devamı)

Örnek No	Disk Difüzyon	Tüp Biofilm Oluşumu	Mikrotitrasyon Plak	PZR ( <i>Esp</i> )
159.	S	-	-	+
160.	S	-	-	-
161.	R	-	-	-
162.	R	-	-	-
163.	S	-	-	-
164.	R	-	-	+
165.	R	-	-	+
166.	S	-	-	-
167.	S	-	-	+
168.	S	-	-	-
169.	R	-	-	+
170.	S	-	-	-

## 5. TARTIŞMA

Nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden olan enterokoklar; (Emori ve Gaynes, 1993; Aliberti, 2008) kan dolaşımı, cerrahi ve idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen en yaygın patojenlerdir (NNIS, 1999). Enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık %75'ini *E. faecalis* oluşturur (Shankar ve ark., 1999). Bununla birlikte *E. faecium* suşlarının daha sık izole edildiğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Aykut Arca ve ark., 2009; Aral ve ark., 2011).

Savcı ve ark. (2018) yaptığı çalışmada 727 enterokok suşunun 450'si (%61,9) *E. faecalis*, 277'si (%38,1) *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Çalışmadaki izolatlardan 110 (%15,1) tanesi kan örneğidir. Vankomisin direnç oranı *E. faecium* izolatlarında %29,9 (80/268), *E. faecalis* izolatlarında %8,6 (37/432) ise olarak belirlenmiştir.

Altun ve ark. (2008) yaptığı çalışmada kullanılan 120 perianal kültürün 12 tanesi vankomisine dirençli *E. faecium* suşu gözlemlenmiştir.

Panesso ve ark. (2010) 'nın yaptığı çalışmada 723 enterokok izolatından en sık *E. faecalis* (%78) izolatı görülmüştür. İzolatların %6'sında vankomisin direnci saptanmıştır.

Bizim çalışmamıza 85 *E. faecalis* (%50) ve 85 *E. faecium* olmak üzere 170 enterokok suşu dahil edilmiştir. Bu suşların (*E. faecalis* %17,6; *E. faecium* %15,3) en sık izole edildikleri bölümler incelendiğinde yoğun bakım üniteleri olduğu görülmüştür. Ayrıca 85 *E. faecalis* izolatının vankomisin duyarlılıklarının; 70 tanesi (%82,3) duyarlı, 14 tanesi (%16,5) orta duyarlı, 1 tanesi (%1,2) dirençli olduğu görüldü. 85 *E. faecium* izolatının ise 56 tanesi (%65,9) duyarlı, 29 tanesi (%34,1) dirençli olduğu görülmüştür.

Biyofilmler, inert yüzeyler veya ölü doku üzerinde sıklıkla gelişebilirler. Ayrıca yaygın olarak medikal cihazlarda ve ölü doku parçalarında da görülebilirler (Lambe ve ark., 1991). Bunun yanında endokardit durumunda olduğu gibi canlı dokularda da oluşabilirler (Costerton, 1999).

Biyofilmlerde büyüme ve gelişme oldukça yavaştır. Bu sebepten dolayı neden oldukları enfeksiyonlar hemen kendini göstermezler (Ward ve ark., 1992). Bakteriler antijenleri serbest bırakır ve antikorların üretimini uyarır, ancak antikorlar biyofilmler içinde bakterileri öldürmede etkili değildirler (Cochrane ve ark., 1988). Mükemmel hücrel ve humoral immün reaksiyonları olan bireylerde bile, biyofilm enfeksiyonları konak savunma mekanizmaları tarafından nadiren çözülür (Khoury ve ark., 1992).



Antibiyotik tedavisi, biyofilmden salınan planktonik hücrelerden kaynaklanan semptomları giderir, ancak biyofilmi öldürmeyi başaramazlar (Marrie ve ark., 1982).

Çeşitli mikroorganizmaların biyofilm üretimlerinin araştırıldığı pek çok çalışma literatürde bulunmaktadır (Knobloch ve ark. 2002; Fidan ve ark. 2005; Mathur ve ark. 2006; Bose ve ark. 2009; Can ve ark. 2009; Hassan ve ark. 2011; Milletli Sezgin'in 2012).

Oli ve ark. (2018) klinik örneklerden elde ettikleri çok ilaca dirençli *E. faecalis* 'lerde biyofilm oluşumunu araştırmışlardır. Bunun için doku kültürü plak yöntemi ve tüp yöntemi kullanmışlardır. Çalışmaya dahil ettikleri 40 izolattan 11 (%27.5)'i güçlü, 22 (%55)'si orta biyofilm üretirken; 7 (%17.5) tanesinin zayıf biyofilm ürettiği veya biyofilm üretmediği görülmüştür. Araştırmacılar çalışmanın sonunda, biyofilm üretiminin nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli rolü olduğu görüşüne varmışlardır.

Fallah ve ark. (2017) idrar yolu enfeksiyonundan izole ettikleri enterokok suşlarında biyofilm oluşumunu ve antimikrobiyal direnci karşılaştırmışlardır. Çalışmaya 9 aylık bir sürede toplanan 57 klinik izolat dahil edilmiştir. Suşların biyofilm oluşturma özellikleri fenotipik olarak modifiye kongo kırmızı agar yöntemi ve mikrotitrasyon plak yöntemiyle araştırılmıştır. Ayrıca PZR yöntemi ile *esp* varlığı incelenmiştir. Fenotipik yöntemlerin sonunda *E. faecalis*'in %26.5'i ve *E. faecium*'un %75'inin biyofilm ürettiği kabul edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar 57 enterokok izolatının 48'inde *esp* varlığı tespit etmişlerdir. Çalışmada *asa1* ve *ebpR* varlığında araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda enterokoklarda in vitro biyofilm oluşumunun çok karmaşık olduğu ve *esp*, *asa1* ve *ebpR* genlerinin varlığının biyofilm üretimi için yeterli olmadığı düşünülmüştür.

Aghdam ve ark. (2017) yaptığı çalışmada ilerlemiş kronik periodontit hastalarından elde edilen diş kök kanal izolatlarında *E. faecalis* virülans genlerinin varlığını değerlendirmişlerdir. Temmuz 2015 ile Ekim 2016 tarihleri arasında diş kök kanalından izole edilen 100 *E. faecalis* türü, 96 kuyulu düz tabanlı polistiren plaklarda yarı-kantitatif yöntem ile biyofilm oluşumu analizinden sonra, *asa*, *esp*, *efaA*, *ace*, *ebpR*, *gel* ve *hyl* geni varlığı PZR ile çalışılmıştır. İzolatların %56'sında *esp* geni olduğu belirlenmiştir. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde, izolatların %49'unu kuvvetli biyofilm üreticisi, %42'sinin de orta derecede biyofilm oluşumu, %10'nunun da zayıf veya hiç biyofilm oluşturmadığı görülmüştür.

*asaI*, *efaA*, *esp* ve *ebpR* pozitif izolatların negatif izolatlarla göre anlamlı olarak daha yüksek biyofilm oluşumu vardır. Bu çalışma, *E. faecalis*'de, *asaI*, *efaA*, *esp* ve *ebpR*'nin varlığının diş kök kanal izolatlarının artmış biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

Creti ve ark. (2004) yaptığı çalışmada klinik izolatlardan, sağlıklı bireylerden ve çevreden izole edilen 74 *E. faecalis* suşunda *esp* geninin varlığı PZR ile araştırılmıştır. *Esp* geni, izolatların %44.6'sında görülmüştür.

Dupre ve ark. (2003) 1998–2001 yılları arasında 47 enterokokkal izolatın (15 *E. faecalis* ve 32 *E. faecium*) virülans faktörleri üzerine çalışma yapmışlardır. 15 *E. faecalis* izolatının 13'ü fenotipik olarak biyofilm oluşturmuş bulunurken, 9'unda *esp* genine rastlanmıştır. 32 *E. faecium* izolatının 5'inde fenotipik olarak biyofilm oluşturmuş bulunurken, 23'ünde *esp* geninin var olduğu görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada incelenen *ace*, *efaA*, *gelE* ve *AS* virülans genleri yalnız *E. faecalis* izolatlarında görüldüğü tespit edilmiştir.

Kafil ve Mobarez (2015) yapmış olduğu çalışmada idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarında *esp*'nin varlığının ve *esp* ile antibiyotik direncinin arasında korelasyon olup olmadığını araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmaya İYE tanılı hastalardan izole edilen 166 enterokok suşu dahil edilmiştir. Bunlardan %43.3'ü *E. faecium*, %56,7'si *E. faecalis* olarak tespit edilmiştir. *Esp* geni *E. faecium* izolatlarının %76.1'inde; *E. faecalis* izolatının ise %77.9'unda pozitif bulunmuştur. Çalışmanın sonunda *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarında *esp* geni varlığı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca *esp* pozitif *E. faecium* suşları ile vankomisin direnci arasında anlamlı korelasyon ( $p<0.01$ ) olduğu görülmüştür. Enterokokların üriner sistem enfeksiyonlarından elde edilen izolatlarda *esp*'in görülme sıklığı, bu genin idrar yolu enfeksiyonlarında önemli olduğunu ve üriner sistem enfeksiyonuna neden olması için, enterokokların yüzeyinde biyofilm oluşturma yeteneğinin önemini ortaya koymuştur.

Udo ve Al-Sweih (2011) çalışmalarına 466 *E. faecalis* izolatu dahil etmişlerdir. Bunların; 313 idrar örneği, 68 yara örneği, 36 kan örneği, 25 rektal swab, 12 vajinal swab ve 12 diğer kaynaklardan elde edilmiştir. Bu örneklerden % 31.5'inde *esp* geni pozitif bulunmuştur.

Baylan ve ark. (2011) idrar kültürlerinden izole edilen toplam 91 enterokok izolatinin (59 *E. faecalis*, 31 *E. faecium* ve 1 *E. gallinarum*) enterokok yüzey proteinini (*esp*) moleküler yöntemlerle araştırmışlardır. Vankomisine dirençli bulunan enterokoklar, ayrıca *vanA* ve *vanB* genlerinin varlığı açısından incelenmiştir. *E. faecium* suşlarından 8 (%25,8)'inin glikopeptidlere dirençli olduğu saptanmış; bunların yedisinin *vanA*, birinin ise *vanA-vanB* dışı direnç tipinde olduğu belirlenmiştir. *Esp*, %25,6 pozitiflik oranları ile çalışmada en sık saptanan virülans faktörleri olmuştur. Çalışmada *esp* geni pozitif *E. faecalis* izolatlarının doksisikline (p=0.043) anlamlı düzeyde daha dirençli oldukları saptanmıştır.

Saba Çopur ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada virülans genleri ve enterokokların MDR genlerinin varlığı PZR ile araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda 116 izolatta, 93 VRE, 23 VSE tespit etmişlerdir. VRE'nin (n=93) %95,6'sı *E. faecium* (n=89), %4.3'ü *E. faecalis* (n=4) iken, VSE'nin (n=23) %17.4'ü *E. faecium* (n=4) ve %82.6'sının *E. faecalis* (n=19) olduğu gözlenmiştir. Tüm VRE izolatlarında *vanA* MDR1 geni tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda VRE izolatlarından sadece *E. faecium* suşlarında *esp* varlığı görülmüştür.

Alwan ve ark. (2018) yaptığı çalışmada sonuçlardan, MTP yönteminin mikroorganizmanın biyofilm oluşturma yeteneğinin taranması ve saptanması için daha güvenilir ve kantitatif bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Mete ve ark. (2017) enterokok türlerinde virülans faktörlerini araştırmışlardır. Çalışmalarına dahil ettikleri 229 enterokok izolatinin %32,3'ünde *esp* tespit etmişlerdir. Bunlardan 138 *E. faecalis* izolatinin 46 (%33.3)'sında, 91 *E. faecium* izolatinin 28 (30,8)'inde *esp* varlığı saptamışlardır (Mete ve ark., 2017).

Çalışmaya dahil edilen izolatlarda biyofilm üreten suşlardan, tüp yönteminde pozitif çıkan 5 izolatin 4'ü vankomisine duyarlı 1'i ise orta duyarlı olarak bulunmuştur. Mikrotitrasyon yöntemiyle biyofilm ürettiği tespit edilen 27 izolatin 21'i vankomisine duyarlı, 6'sı orta duyarlı olarak bulunmuştur.

Vankomisin direnç durumlarıyla PZR işlemi karşılaştırıldığında *esp* pozitif bulunan *E. faecalis* izolatlarında 43 duyarlı, 5 orta duyarlı, 1 dirençli; *E. faecium* izolatlarında ise 9 duyarlı ve 11 dirençli olduğu bulunmuştur.

Çalışmada biyofilm üretimini tespit etmede kullanılan fenotipik yöntemler karşılaştırıldığında; tüp yönteminde pozitif çıkan beş izolatın hepsinin aynı zamanda mikrotitrasyon yönteminde de pozitif olduğu görülmüştür.

Kullanılan her iki fenotipik yöntemde de biyofilm üretimi pozitif olan suşların tamamının *E. faecalis* olduğu gözlenmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda *E. faecalis* ve *E. faecium* arasında vankomisin direnci, tüp ve mikrotitrasyon plak yöntemiyle tespit edilen biyofilm varlığı ve PZR ile tespit edilen *esp* varlığı arasında anlamlı fark tespit edilmiştir.

PZR işleminin sonucunda 85 *E. faecalis* suşunun 49 tanesi (%57,6), 85 *E. faecium* suşunun 20 tanesi (%23,5) pozitif olarak bulunmuştur. Fenotipik yöntemler ile genotipik yöntem karşılaştırıldığında mikrotitrasyon plak yönteminde pozitif olan izolatlardan 24 tanesi, tüp yönteminde pozitif olan izolatlardan ise 5 tanesinde *esp* geninin varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre *esp* geninin biyofilm oluşumu ile ilgisi olabileceği ancak tek başına *esp* varlığının biyofilm oluşumu için yeterli olamayacağı düşünülmektedir.

## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmada kullanılan *E. faecalis* izolatları %17,6 oranıyla en sık yoğun bakım servisinden, *E. faecium* izolatları ise %15,3 oranıyla en sık yoğun bakım ve hematoloji servisinden izole edilmiştir.
- Tüp yöntemi sonucunda enterokok izolatlarından 5 (%5,9) tanesinin biyofilm ürettiği görüldü. 5 suştan 1 tanesi +3 değeri ile pozitif olduğu görülürken; kalan 4 izolatın +2 pozitiflik değeri aldığı görülmektedir.
- Tüp yöntemi sonucunda pozitif çıkan 5 suşun tamamının *E. faecalis* türü olduğu gözlemlendi.
- Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucunda 27 izolatın (%31,8) biyofilm üretimi yapabildiği görüldü.
- Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucunda pozitif olan suşların hepsinin *E. faecalis* olduğu da gözlemlendi.
- Tüp yönteminde pozitif çıkan beş izolatın hepsinin aynı zamanda mikrotitrasyon yönteminde de pozitif olduğu görülmüştür.
- Vankomisin direnç durumlarına göre *E. faecalis*'de 70 tanesi (%82,3) duyarlı, 14 tanesi (%16,5) orta duyarlı, 1 tanesi (%1,2) dirençlidir. *E. faecium*'da ise 56 tanesi (%65,9) duyarlı, 29 tanesi (%34,1) dirençli olduğu görülmüştür.
- Tüp yöntemi sonucu pozitif çıkan 5 suştan 4 tanesi (%80) duyarlı, 1 tanesi (%20) orta duyarlıdır.
- Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucu pozitif çıkan 27 suştan ise 21 tanesi (%77,8) duyarlı, 6 tanesi (%22,2) orta duyarlıdır.
- PZR işleminin sonucunda 85 *E. faecalis* suşunun 49 tanesi (%57,6), 85 *E. faecium* suşunun 20 tanesi (%23,5) pozitif olarak bulunmuştur.
- Fenotipik yöntemler ile genotipik yöntem karşılaştırıldığında mikrotitrasyon plak yönteminde pozitif olan izolatlardan 24 tanesi, tüp yönteminde pozitif olan izolatlardan ise 5 tanesinde *esp* geninin varlığı tespit edilmiştir.
- Vankomisin direnç durumlarıyla PZR işlemi karşılaştırıldığında *esp* pozitif bulunan *E. faecalis* izolatlarında 43 duyarlı, 5 orta duyarlı, 1 dirençli; *E. faecium* izolatlarında ise 9 duyarlı ve 11 dirençli olduğu bulunmuştur.

- Yapılan istatistiksel analizler sonucunda *E. faecalis* ve *E. faecium* arasında tüm yöntemlerde anlamlı fark tespit edilmiştir.
- *Esp* geninin biyofilm oluşumu ile ilgisi olabileceği ancak tek başına *esp* varlığının biyofilm oluşumu için yeterli olamayacağı düşünülmektedir.
- Konu ile ilgili yapılacak yeni çalışmalar biyofilm oluşumu ile ilgili yeni ve faydalı veriler sağlayabilecektir.



## KAYNAKLAR

- Aghdam, MA., Barhaghi, MS., Aghazadeh, M., Jafari, F., Hagh, MB., Haghdoost, M., Memar, MY., Ahangarzadeh Rezaee, M., Samadi Kafil, H. Virulence genes in biofilm producer *Enterococcus faecalis* isolates from root canal infections. Cell Mol Biol (Noisy le Grand) 2017;63(5).
- Akan Ö. Enterococcus. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M. Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009; 430-454.
- Aliberti, LC. Enterococcal nosocomial infection: epidemiology and practice. Gastroenterology nursing: the official journal of the Society of Gastroenterology Nurses and Associates, 1995;18(5):177-181.
- Altun, B., Cengiz, AB., Kara, A., Ceyhan, M., Ünal, S., Seçmeer, G., Gür, D. First vancomycin-resistant blood isolate of *Enterococcus faecium* in a children's hospital and molecular analysis of the mechanism of resistance. Turk J Pediatr 2008;50(6):554.
- Alwan, MG., Usup, G., Heng, LY., Ahmad, A. Biofilm forming ability of bacteria isolated from necrotic roots canals of teeth. AIP Conf Proc. 2018; (Vol. 1940, No. 1, p. 020078). AIP Publishing.
- Anwar, H., Strap, JL., Costerton, JW. Kinetic interaction of biofilm cells of *Staphylococcus aureus* with cephalexin and tobramycin in a chemostat system. Am Soc Microbiol 1992;36(4):890-893.
- Anwar, H., Van Biesen, T., Dasgupta, MRIN AL., Lam, K., Costerton, JW. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. Am Soc Microbiol 1989;33(10):1824-1826.
- Aral, M., Paköz, NİE., Aral, İ. Doğan, S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci. Turk Hij Den Biyol Derg 2011;68(2): 85 – 92.
- Arıkan Akan Ö. Enterokok türlerinin mikrobiyolojisi ve antimikrobiyal direnç. Arman, D., Ünal, S. Editörler, Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar, 1. Baskı, Ankara, Bilimsel tıp yayınevi 2009; 137-149.
- Aykut Arca E. Mert Dinç B. Karabiber N. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Türlerinin Kliniklere Dağılımı, Turk Hij Den Biyol Derg 2009;1.
- Barnes, EM. Tetrazolium Reduction as a Means of Differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. J. gen. Microbiol 1956;14: 57-68.
- Baylan, O., Nazik, H., Bektöre, B., Çitil, B. E., Turan, D., Öngen, B., Özyurt, M., Açık, CH., Haznedaroğlu, T. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virulens faktörleri arasındaki ilişki. Mikrobiyol Bul 2011;45(3):430-445.
- Beargie, R., Lynd, P., Tucker, E., Duhring, J. Perinatal infection and vaginal flora. Am J Obstet Gynecol 1975;122(1):31-33.
- Bektöre, B. Stafilokoklar için Slime Testi, Başustaoğlu, A.Yıldırım, ŞT. Editör, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı, 3. Baskı, Ankara, Atlas Yayıncılık. 2014; 13.16.3.

- Benno, Y., Suzuki, K., Suzuki, K., Narisawa, K., Bruce, WR., Mitsuoka, T. Comparison of the fecal microflora in rural Japanese and urban Canadians. *Microbiol. Immunol* 1986;30(6):521-532.
- Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase from *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens. *J Bacteriol* 1964;88:653-659.
- Bolister, N., Basker, M., Hodges, NA., Marriott, C. The diffusion of  $\beta$ -lactam antibiotics through mixed gels of cystic fibrosis-derived mucin and *Pseudomonas aeruginosa* alginate. *J Antimicrob Chemother* 1991;27(3):285-293.
- Bose, S., Khodke, M., Basak, S., Mallick, SK. Detection of biofilm producing staphylococci: need of the hour. *J Clin Diagn Res* 2009;3(6), 1915-1920.
- Boyd, DA., Willey, BM., Fawcett, D., Gillani, N., Mulvey, MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(7):2667-2672.
- Brown, MRW., Gilbert, P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* 1993;74:87S-97S.
- Busscher, HJ., Bos, R., Van der Mei, HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS microbiology letters* 1995;128(3):229-234.
- Can, F., Kaya, M., Bayindir, FB., Uncu, H., Demirbilek, M., Yazici, AC. Activity of tigecycline on planktonic and sessile cells of *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul* 2009;43(4):587-595.
- Characklis, WG. Physiological ecology in biofilm systems. *Biofilms*.1990
- Cheema, MS., Rassing, JE., Marriott, C. The diffusion characteristics of antibiotics in mucus glycoprotein gels. *J Pharm Pharmacol* 1986;38(S12):53P-53P.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, BL., Hughson, FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002;415(6871):545.
- Chen, X., Stewart, PS. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction– diffusion interaction. *Environ Sci Technol*. ACS Publications 1996;30(6):2078-2083.
- Christensen, GD., Simpson, WA., Younger, JJ., Baddour, LM., Barrett, FF., Melton, DM., Beachey, EH. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22(6):996-1006.
- Cochrane, DM., Brown, MRW., Anwar, H., Weller, PH., Lam, K., Costerton, JW. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol* 1988;27(4):255-261.
- Costerton, JW., Lewandowski, Z., Caldwell, DE., Korber, DR., Lappin-Scott, HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49(1):711-745.
- Costerton, JW., Stewart, PS., Greenberg, EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284(5418):1318-1322.



- Coulthurst, SJ., Whitehead, NA., Welch, M., Salmond, GP. Can boron get bacteria talking? Trends Biochem Sci 2002;27(5):217-219.
- Courvalin, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci CID 2006;42(Supplement\_1):S25-S34.
- Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R., Baldassarri, L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. J Med Microbiol 2004;53(1):13-20.
- Cross, CE., Halliwell, B., Borish, ET., Pryor, WA., Ames, BN., Saul, R.L., McCord, JM., Harman, D. Oxygen radicals and human disease. Annals of internal medicine, 1987;107(4): 526-545.
- Çetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev 2000;13(4):686-707.
- Davies, DG., Chakrabarty, AM., Geesey, GG. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 1993;59(4):1181-1186.
- Davies, DG., Parsek, MR., Pearson, JP., Iglewski, BH., Costerton, JW., Greenberg, EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 1998;280(5361):295-298.
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. Biotechnol Biomed Eng 1994;43(11):1131-1138.
- Deibel, RH. The group D streptococci. Bacteriol Rev 1964;28(3):330-366.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 167-193.
- Donlan, RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8(9):881.
- Dougherty, SH. Role of enterococcus in intraabdominal sepsis. Am J Surg. 1984;148(3):308-312.
- Dunn, AK., Handelsman, J. Toward an understanding of microbial communities through analysis of communication networks. Antonie Van Leeuwenhoek 2002;81(1-4):565-574.
- Duprè, I., Zanetti, S., Schito, AM., Fadda, G., Sechi, LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). J Med Microbiol 2003;52(6):491-498.
- Durmaz G. Enterokoklar. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M.). 3. Baskı, cilt no 2, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2008;2057- 2065.
- Eaton, TJ., Gasson, MJ. A Variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. FEMS Microbiol Lett 2002; 216(2); 269-275.
- Edelstein, H., McCabe, RE. Perinephric abscess. Modern diagnosis and treatment in 47 cases. Medicine 1988;67(2):118-131.

- Emori, TG, Gaynes, RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev 1993;6(4):428-442.
- Esen Ş. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar ve tedavi seçenekler. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Editör, Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları, 1. Baskı, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004;159-170.
- Facklam, RR., Carey, RB. Streptococci and aerococci. Lennette, EH, Balows, A, Hausler, WJ., Jr, Shadomy HJ. editors. Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for Microbiology Washington DC 1985;154-175.
- Facklam, RR., Collins, MD. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989;27(4):731-734.
- Fallah, F., Yousefi, M., Pourmand, MR., Hashemi, A., Alam, AN., Afshar, D. Phenotypic and genotypic study of biofilm formation in Enterococci isolated from urinary tract infections. Microb Pathog 2017;108:85-90.
- Fidan, I., Yüksel, S., Çetin Gürel, F. Koagülaz negatif stafilokok suşlarında biyofilm oluşumu ve siprofloksasinin biyofilm üzerine etkisi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2005;35:149-152.
- Fischer, W., Nakano, M., Laine, RA., Bohrer, W. On the relationship between glycerophosphoglycolipids and lipoteichoic acids in Gram-positive bacteria. I. The occurrence of phosphoglycolipids. Biochim Biophys Acta 1978a;528(3):298-308.
- Fischer, W., Nakano, M., Laine, RA., Bohrer, W. On the relationship between glycerophosphoglycolipids and lipoteichoic acids in Gram-positive bacteria. I. The occurrence of phosphoglycolipids. Biochim Biophys Acta 1978b;528(3):288-297.
- Flemming, CA., Palmer Jr, RJ., Arrage, AA., Van der Mei, HC., White, DC. Cell surface physicochemistry alters biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide mutants. Biofouling 1998;13(3):213-231.
- Galli, D, Lottspeich, F, Wirth, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. Mol Microbiol 1990;4(7): 895-904.
- Garvey, GJ.,& Neu, HC. Infective endocarditis—an evolving disease: a review of endocarditis at the Columbia-Presbyterian Medical Center, 1968–1973. Medicine 1978;57(2):105-128.
- Gibbs, RS., Listwa, HM., Dreskin, RB. A pure enterococcal abscess after cesarean section. J Reprod Med 1977;19(1):17-20.
- Gordon, CA., Hodges, NA., Marriott, C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 1988;22(5):667-674.
- Gorensek, MJ., Lebel, MH., Nelson, JD. Peritonitis in children with nephrotic syndrome. Pediatrics 1988;81(6):849-856.
- Gross, PA., Harkavy, LM., Barden, GE., Flower, MF. The epidemiology of nosocomial enterococcal urinary tract infection. Am J Med Sci 1976;272(1):75-81.
- Gülây Z, Gram pozitif bakteri enfeksiyonları: Direnç ve epidemiyolojisi, Ankem Derg 2008; 22(Ek 2):276-286.

- Gültekin M. Enterokoklar mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Editör, Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları, 1. Baskı, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004;121-171.
- Harding, GKM, Ronald, AR. A controlled study of antimicrobial prophylaxis of recurrent urinary infection in women. *N Engl J Med* 1974;291(12):597-601.
- Hartman, PA, Reinbold, GW, Saraswat, DS. Indicator organisms—A review. I. Taxonomy of the fecal streptococci. *Int J Syst Evol Microbiol* 1966; 16(2):197-221.
- Hashem, YA., Amin, HM., Essam, TM., Yassin, AS., Aziz, RK. Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Sci Rep* 2017;7(1):5733.
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011;15(4):305-311.
- Heikens, E., Leendertse, M., Wijnands, LM., van Luit-Asbroek, M., Bonten, MJ., van der Poll, T., Willems, RJ. Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiol* 2009;9(1):19.
- Holland, SP., Mathias, RG., Morck, DW., Chiu, J., Slade, SG. (2000). Diffuse lamellar keratitis related to endotoxins released from sterilizer reservoir biofilms. *Ophthalmology* 2000;107(7):1227-1233.
- Holmberg, A., Mörgelin, M., Rasmussen, M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2011;67(2):433-439.
- Holmberg, A., Rasmussen, M. Antibiotic regimens with rifampicin for treatment of *Enterococcus faecium* in biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44(1):78-80.
- Huycke MM, Joyce W, Wack MF. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 1996;173(3):743-746.
- Huycke, MM, Abrams, V, Moore, DR. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002; 23(3):529-536.
- Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;183(2):201-207.
- Ike Y, Hashimoto H, Clewell, DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987;25(8):1524-1528.
- Ike, Y, Hashimoto, H, Clewell, DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun* 1984;45(2):528-530.
- Ike, Y, Clewell, DB. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. *J Bacteriol* 1992;174(24): 8172-8177.

- Ishida, H., Ishida, Y., Kurosaka, Y., Otani, T., Sato, K., Kobayashi, H. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm - producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(7):1641-1645.
- Jefferson, KK., Pier, DB., Goldmann, DA., Pier, GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004;186(8):2449-2456.
- Kafil, HS., Mobarez, AM. Spread of enterococcal surface protein in antibiotic resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from urinary tract infections. *Open Microbiol J* 2015;9:14.
- Karlowsky, JA., Walkty, AJ., Baxter, MR., Arhin, FF., Moeck, G., Adam, HJ., Zhanel, GG. In vitro activity of Oritavancin against gram-positive pathogens isolated in Canadian hospital laboratories from 2011 to 2015. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87(4):349-356.
- Kayaoglu, G, Ørstavik, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(5):308-320.
- Khoury, AE., Lam, K., Ellis, B., Costerton, JW. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J* 1992;38(3):M174-8.
- Knobloch, JKM., Horstkotte, MA., Rohde, H., Mack, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002;191(2):101-106.
- Koenig, MG., Kaye, D. Enterococcal endocarditis: report of nineteen cases with long-term follow-up data. *N Engl J Med* 1961;264(6):257-264.
- Korten V. Hastane infeksiyonlarına yol açan gram pozitif bakterilerde direnç sorunu. Ulusoy S. Editör, Gram Pozitif Kok İnfeksiyonları; Sorunlar ve Çözümler, Ankara; Güneş Kitabevi. 2003;11-13.
- Kostyukova, NN., Volkova, MO., Ivanova, VV., Kvetnaya, AS. A study of pathogenic factors of *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995;10(2):133-138.
- Kreft, B, Marre, R., Schramm, U, Wirth, R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992; 60(1):25-30.
- Kumon, H., Tomochika, KI., Matunaga, T., Ogawa, M., Ohmori, H. A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. *Microbiol Immunol* 1994;38(8):615-619.
- Lambe, JD., Ferguson, KP., Mayberry-Carson, KJ., Tober-Meyer, B., Costerton, JW. Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1991;(266):285-294.
- Lawrence, JR., Korber, DR., Hoyle, BD., Costerton, JW., Caldwell, DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991;173(20):6558-6567.

- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., Willems, R. J. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* 2004;186(3): 672-682.
- Lebreton, F., Depardieu, F., Bourdon, N., Fines-Guyon, M., Berger, P., Camiade, S., Leclercq, R., Courvalin, P., Cattoir, V. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;AAC-00714.
- Ledger, WJ., Norman, M., Gee, C., Lewis, W. Bacteremia on an obstetric-gynecologic service. *Am J Obstet Gynecol* 1975;121(2):205-212.
- Leigh, DA. Peritoneal infections in patients on long-term peritoneal dialysis before and after human cadaveric renal transplantation. *J Clin Pathol* 1969;22(5):539-544.
- Lewis, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):999-1007.
- Lindsay, D., Holy, AV. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2006;64(4):313-325.
- Liu, X., Roe, F., Jesaitis, A., Lewandowski, Z. Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-amino-1, 2, 4-triazole. *Biotechnol Bioeng* 1998;59(2):156-162.
- Macaulay, D. Acute endocarditis in infancy and early childhood. *Am J Dis Child* 1954;88(6):715-731.
- Mäkinen PL, Clewell DB, An F, Mäkinen KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ('gelatinase') from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J Biol Chem* 1989;264(6):3325-3334.
- Mandell, GL., Kaye, D., Levison, ME., Hook, EW. Enterococcal endocarditis: an analysis of 38 patients observed at the New York Hospital-Cornell Medical Center. *Arch Intern Med* 1970;125(2):258-264.
- Marrie, TJ., Nelligan, J., Costerton, JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circ* 1982;66(6):1339-1341.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, DJ., Fatma, T., Rattan, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006;24(1):25.
- McCallum, RW., Curry, N., Guth, PH. Spontaneous Peritonitis in Cirrhotic Ascites: A Decade of Experience. *Ann Intern Med* 1973;78(5):816-816.
- McKessar, SJ., Berry, AM., Bell, JM., Turnidge, JD., Paton, JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(11):3224-3228
- Meluleni, GJ., Grout, M., Evans, DJ., Pier, GB. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol* 1995;155(4):2029-2038.

- Mendes, RE., Castanheira, M., Farrell, DJ., Flamm, RK., Sader, HS., Jones, RN. Longitudinal (2001–14) analysis of enterococci and VRE causing invasive infections in European and US hospitals, including a contemporary (2010–13) analysis of oritavancin in vitro potency. *J Antimicrob Chemother* 2016;71(12):3453-3458.
- Mendes, RE., Farrell, DJ., Sader, HS., Jones, RN. Oritavancin microbiologic features and activity results from the surveillance program in the United States. *Clin Infect Dis*. 2012;54(suppl\_3):S203-S213.
- Mete, E., Kaleli, İ., Cevahir, N., Demir, M., Akkaya, Y., Satılmış, ÖK. Enterokok Türlerinin Virulans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2017;51(2):101-114.
- Miller, MB., Bassler, BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001;55(1):165-199.
- Milletli Sezgin F. *Acinetobacter baumannii* izolatlarında biyofilm üretimi ve kolistin duyarlılıklarının biyofilm formasyonunda araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Uzmanlık Tezi, 2012; 33-37.
- Moellering, RC., Watson, BK., Kunz, LJ. Endocarditis due to group D streptococci: comparison of disease caused by *Streptococcus bovis* with that produced by the enterococci. *Am J Med* 1974;57(2):239-250.
- Mohamed, JA., Huang, DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* 2007;56(12):1581-1588.
- Murray, B. E. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev* 1990;3(1):46-65.
- Murray, B.E., Nannini, EC. Glycopeptides (vancomycin and teicoplanin), streptogramins (quinupristin-dalfopristin), and lipopeptides (daptomycin). *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Oxford: Churchill Livingstone, 2005;417-40.*
- Neudorfer, K., Schmidt-Malan, SM., Patel, R. Dalbavancin is active in vitro against biofilms formed by dalbavancin-susceptible enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90(1):58-63.
- Nichols, WW., Dorrington, SM., Slack, MP., Walmsley, HL. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(4):518-523.
- Nickel, JC., Costerton, JW. Bacterial biofilms and catheters: A key to understanding bacterial strategies in catheter-associated urinary tract infection. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 1992;3(5):261-267.
- Nickel, JC., Ruseska, I., Wright, JB., Costerton, JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27(4):619-624.
- NNIS, S. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. A report from the NNIS System. *Am J Infect Control* 1999;27(6):520.

- Oli, AK., Rajeshwari, S. Biofilm formation by multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol* 2017;2(2):284-288.
- Olmsted, SB, Dunny, GM, Erlandsen, SL, Wells, CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis* 1994;170(6):1549-1556.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. Biofilm formation as microbial development *Annu Rev Microbiol* 2000;54(1):49-79.
- Özkaya Şahin G. Gram-pozitif kok infeksiyonları. Ulusoy S. Editör, Gram Pozitif Kok İnfeksiyonları; Sorunlar ve Çözümler, Ankara; Güneş Kitabevi. 2003; 1-9.
- Panesso, D. Reyes, J. Rincón, S. Díaz, L. Galloway-Peña, J. Zurita, J. Carrillo, C. Merentes, A. Guzman, M. Adachi, JA. Murray, BE. Arias, CA. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol* 2010;48(5):1562-1569.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., Hook, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48(1):585-617.
- Perichon, B., Reynolds, P., Courvalin, P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(9):2016-2018.
- Rakita, RM, Vanek, NN, Jacques-Palaz, K, Mee, M, Mariscalco, MM, Dunny, GM, Snuggs, M, Winkle WBV, Simon, SI. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect Immun* 1999; 67(11):6067-6075.
- Reiner, NE., Gopalakrishna, KV., Lerner, PI. Enterococcal endocarditis in heroin addicts. *Jama* 1976;235(17):1861-1863.
- Rioufol, C., Devys, C., Meunier, G., Perraud, M., Goulet, D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *J Hosp Infect* 1999;43(3):203-209.
- Saba Çopur Ş., Şahin, F., Göçmen, JS. 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.
- Sandoe, JA., Wysome, J., West, AP., Heritage, J., Wilcox, MH. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother* 2006;57(4):767-770.
- Sava G, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:533-540.
- Sava, IG., Zhang, F., Toma, I., Theilacker, C., Li, B., Baumert, TF., Holst, O., Linhardt, RJ., Huebner, J. Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of enterococci to human cells. *J Antimicrob Chemother* 2009;284(27):18194-18201.

- Savcı, Ü., Şahin, M., Eser, B. Klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarında antibiyotik dirençlerinin değerlendirilmesi. J Health Sci Med 2018;1(1):4-8.
- Scheld, WM., Mandell, GL. Enigmatic enterococcal endocarditis. Ann Intern Med. 1984;100(6):904-905.
- Schleifer, K. H, Kilpper-Bälz, R. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 1984;34(1):31-34.
- Shankar, V., Baghdayan, AS., Huycke, MM., Lindahl, G., Gilmore, MS. (1999). Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun 1999; 67(1):193-200.
- Shankar, N., Baghdayan, AS., Gilmore, MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Nature 2002;417(6890):746.
- Shankar, N., Lockatell, CV., Baghdayan, AS., Drachenberg, C., Gilmore, MS., Johnson, DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein ESP in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immun 2001;69(7):4366-4372.
- Sherman, JM. The streptococci. Bacteriol Rev 1937;1(1):3-97.
- Shlaes, DM., Levy, J., Wolinsky, E. Enterococcal bacteremia without endocarditis. Arch Intern Med 1981;141(5):578-581.
- Stewart, PS. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. Biotechnol Bioeng 1998;59(3):261-272.
- Stewart, PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(11):2517-2522.
- Stewart, PS., Costerton, JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001;358(9276):135-138.
- Stewart, PS., Raquepas, JB. Implications of reaction-diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents. Chemosphere 1995;50(19):3099-3104.
- Suci, PA., Mittelman, MW., Yu, FP., Geesey, GG. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(9):2125-2133.
- Süßmuth, SD, Muscholl-Silberhorn, A, Wirth, R, Susa, M, Marre, R, Rozdzinski, E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. Infect Immun 2000;68(9):4900-4906.
- Şardan YÇ. Hastane Enfeksiyonları: Tanımlar, Sürveyans, Epidemilere Yaklaşım. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri 2008;545-557.
- Taga, ME., Bassler, BL. Chemical communication among bacteria. National Academy of Sciences 2003;100(suppl 2):14549-14554.



- Tande, AJ., Patel, R. Prosthetic joint infection. Clin Microbiol Rev 2014;27(2):302-345.
- Teixeira LM, Carvalho MGS, Facklam RR. Enterococcus, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ Landry ML, Pfaller MA, Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık 2009;430-443.
- Tendolkar, PM, Baghdayan, AS, Shankar, N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 2003; 60(12):2622-2636.
- Tendolkar, PM., Baghdayan, AS., Gilmore, MS., Shankar, N. Enterococcal surface protein, *Esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun 2004;72(10):6032-6039.
- Tendolkar, PM., Baghdayan, AS., Shankar, N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, *Esp*, is sufficient for *Esp*-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. J Bacteriol 2005;187(17):6213-6222.
- Theilacker, C., Sanchez-Carballo, P., Toma, I., Fabretti, F., Sava, I., Kropec, A., Otto, H., Huebner, J. Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. Mol Microbiol 2009;71(4):1055-1069.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, MJ., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, JR., Lasa, I. The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2001;67(10):4538-4545.
- Trotter, KM, Dunny, GM. Mutants of *Enterococcus faecalis* deficient as recipients in mating with donors carrying pheromone-inducible plasmids. Plasmid 1990;24(1):57-67.
- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 1. baskı, İzmir, Asya Tıp Kitabevi. 2005.
- Udo, EE., Al-Sweih, N. Frequency of virulence-associated genes in *Enterococcus faecalis* isolated in Kuwait hospitals. Med Princ Pract 2011;20(3):259-264.
- Upadhyaya, PG, Ravikumar, KL, Umopathy, BL. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. Indian J Med Microbiol 2009;27(4):301-305.
- Us, D. Serolojik Tanı Yöntemleri. 1. Baskı, Ankara, Hacettepe üniversitesi yayınları. 2006; 39.
- Uttley, AH. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988;2:57-58.
- Van Loosdrecht, Mc., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, Aj. Influence Of Interfaces On Microbial Activity. Microbiol Rev 1990;54(1):75-87.
- Vanek, NN, Simon, SI, Jacques-Palaz, K, Mariscalco, MM, Dunny, GM, Rakita, RM. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;26(1):49-60.

- Vergis, EN, Shankar, N, Chow, JW, Hayden, MK, Snyderman, DR, Zervos, MJ, Linden, PK, Wagener, MM, Muder, RR. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin Infect Dis 2002; 35(5):570-575.
- Vincent, FC., Tibi, AR., Darbord, JC. A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxin. ASAIO Trans 1989;35(3):310-313.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, GA., Fischer, ER., Otto, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in Staphylococcus epidermidis. J Infect Dis 2003;188(5):706-718.
- Vural, T., Çekercioglu, AO., Ögünç, D., Gültekin, M., Çolak, D., Yesilipek, A., Ünal, S., Kocagöz, S., Mutlu, G. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* su u. *Ankem Derg* 1999;3(1):1-4.
- Wanner, G, Formanek, H, Galli, D, Wirth, R. Localization of aggregation substances of *Enterococcus faecalis* after induction by sex pheromones. Arch Microbiol 1989;151(6):491-497.
- Ward, KH., Olson, ME., Lam, K., Costerton, JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. J Med Microbiol 1992;36(6):406-413.
- Weinstein, MP., Iannini, PB., Stratton, CW., Eickhoff, TC. Spontaneous bacterial peritonitis: a review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. Am J Med 1978;64(4):592-598.
- Whittaker, CJ., Klier, CM., Kolenbrander, PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu. Rev. Microbiol 1996;50(1):513-552.
- Wilson, WR., Wilkowske, CJ., Wright, AJ., Sande, MA., Geraci, JE. Treatment of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant enterococcal endocarditis. Ann Intern Med 1984;100(6):816-823.
- Xavier, KB., Bassler, BL. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. Curr Opin Microbiol 2003;6(2):191-197.
- Xu, X., Stewart, PS., Chen, X. Transport limitation of chlorine disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* entrapped in alginate beads. Biotechnol Bioeng 1996;49(1):93-100
- Xu, X., Lin, D., Yan, G., Ye, X., Wu, S., Guo, Y., Zhu, D., Hu, F., Zhang, Y., Wang, F., Jacoby, GA., Wang, M. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(11):4643-4647.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., Yokota, T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. J Med Microbiol 1994;41(5):359-367.
- Zhanel, GG., Calic, D., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Adam, H., Lagacé-Wiens, PR., Rubinstein, E., Gin, AS., Hoban, DJ., Karlowsky, JA. New lipoglycopeptides. Drugs 2010;70(7):859-886.
- Zhanel, GG., Schweizer, F., Karlowsky, JA. Oritavancin: mechanism of action. Clin Infect Dis 2012;54(suppl\_3):S214-S219.

## EKLER



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/1140

15 .09.2017

Sayın Yrd.Doç.Dr. Kemal BİLGİN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Kandan İzole Edilen *Enterococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması** başlıklı OMÜ KA EK 2017/321 Karar nolu Biyokimya çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 14.09.2017 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

  
Prof.Dr.Emine ŞEN TUNÇ

Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başk. Yrd.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Zeynep ÖZKÖK  
**Doğum Yeri** : Bakırköy / İSTANBUL  
**Doğum Tarihi** : 24.04.1992  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Bildiği Yabancı Diller** : İngilizce  
**Eğitim Durumu**  
**(Kurum ve Yıl)** :Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat  
Fakültesi Biyoloji Bölümü 2015 – Mezun  
**E-posta** : zeynepozkok57@gmail.com