



KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok İzolatlarında
Virülans Genlerinin Araştırılması

Eyyup ATLAMA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Didem ÖZGÜR

2.DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nurullah ÇİFTÇİ

2025-KARS



KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok İzolatlarında
Virülans Genlerinin Araştırılması

Eyyup ATLAMA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Didem ÖZGÜR

2.DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nurullah ÇİFTÇİ

Bu tez çalışması BAP tarafından 2023-TS-94 proje numarası ile desteklenmiştir.
2025-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde
..... tarafından hazırlanmış olan Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok
İzolatlarında Virülans Genlerinin Araştırılması adlı bu çalışma, yapılan tez savunması
sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmenliği uyarınca
değerlendirilerek oy ile edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 31/07/2025

Adı Soyadı

İmza

Başkan:

Üye:

Üye:

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../ .../... gün ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ETİK BEYAN

Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bilimsel yöntemlerle ve deneylerin tarafımda yapılıp elde edildiğini, bana ait olmayan veri, düşünce ve sonuçlara uygun atıf ve kaynak gösterdiğimi bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Eyyup ATLAMA

Tarih:

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana ışık tutan, her konuda desteklerini esirgemeyen, tez çalışmam boyunca karşılaştığım zorluklara çözümler sunarak sabırla yanıtlayan kıymetli danışmanım Doç. Dr. Didem ÖZGÜR'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim süresince, laboratuvar çalışmalarında ve tez sürecimde bilgi, deneyim ve rehberliğiyle bana büyük katkı sağlayan, değerli ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Nurullah ÇİFTÇİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgi birikimleri ile bana katkıda bulunan, akademik üslubu ve bakış açısını benimsememde yardımcı olan çok değerli bölüm hocalarım, Prof. Dr. Özgür ÇELEBİ'ye, Doç. Dr. Murat KARAMEŞE'ye, Doç. Dr. Çiğdem Eda BOZLAK'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince laboratuvar ortamında bana sonsuz desteklerini sunan, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm değerli personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim sürecim boyunca motivasyon kaynağım olan, bakış açımı değiştirmemde ve bu süreci daha keyifli hale getirmemde her zaman yanımda olan sevgili ablam Tuba BENLİ'ye; maddi ve manevi destekleriyle daima arkamda duran kıymetli babam Süleyman ATLAMA'ya ve canım annem Zeynep ATLAMA'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	II
ONAY	III
ETİK BEYAN	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Tarihçe ve Sınıflandırma	5
2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	7
2.2.1.Boyanma Özellikleri	7
2.2.2.Üreme ve Fizyolojik Özellikleri	8
2.2.3. Hücre Duvarı Yapısı	8
2.3. Patojenite	9
2.4. Virülans Faktörleri	12
2.4.1. Ekstraselüler Faktörler	13
2.4.1.1. Hemolizin/Sitozilin	13
2.4.1.2. Salgılanan Antijen A	14
2.4.1.3. Jelatinaz	14
2.4.1.4. Hiyalüronidaz	15
2.4.1.5. Seks Feromonları	16
2.4.2. Hücre Yüzeyine Bağlı Faktörler	16
2.4.2.1. Enterokokal Yüzey Proteini	16
2.4.2.2. Agregasyon Faktörleri	17
2.4.2.3. Enterokok MSCRAMM'leri	18

2.4.2.4. Kollajen Bağlayıcı Adezin/Protein	18
2.4.2.5. Endokardit-ölgül Antijen A	19
2.4.2.6. Endokardit ve Biyofilm ile İlişkili Pilus	19
2.5. Klinik Enfeksiyonlar	20
2.5.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları	21
2.5.2. Endokardit	21
2.5.3. Bakteriyemi	21
2.5.4. Karın İçi ve Pelvik Enfeksiyonları	22
2.5.5. Yara ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	22
2.5.6. Menenjit	23
2.6. Epidemiyoloji	23
2.7. İdentifikasyon	24
2.7.1.Cins Ve Tür Düzeyinde Tanımlama	25
2.7.2. Moleküler Yöntemler	27
2.8. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci	28
2.8.1. Aminoglikozid Direnci	29
2.8.2. Glikopeptid Direnci	30
2.8.3. B -Laktam Direnci	31
2.8.4. Oksazolidinon Direnci	31
2.8.5. Tetrasiklin Direnci	32
2.8.6. Lipopeptid Direnci	32
2.9. Vankomisin Dirençli Enterokoklar	33
2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi	34
3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Araştırmanın Türü ve Örnek Seçimi	35
3.2. Kullanılan araç ve gereçler	35
3.2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	35
3.2.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	36
3.2.3. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar	37
3.2.4. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	38
3.2.5. Kullanılan Bilgisayar ve Yazılım Programları	38
3.3. Yöntemler	39

3.3.1. Klinik Örneklerin Toplanması ve Enterokok İzolatlarının İdentifikasyonu	39
3.3.2. İzolatların Canlandırılması	39
3.3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	39
3.3.4. DNA Örneklerinin Elde Edilmesi	40
3.3.5. DNA'ların Nanodrop Spektrofotometre ile Ölçümü	41
3.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu uygulaması	41
3.3.6.1. Enterokok Türlerinin Belirlenmesi	41
3.3.6.2. Virülans Faktörlerinin Belirlenmesi	45
3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi	49
3.3.8. İstatiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
4.1. İzolatların Özellikleri	51
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	51
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuçları	52
4.3.1. Enterokok Türlerinin Dağılımı	52
4.3.2. Virülans Faktör Genlerinin Dağılımı	54
4.4. Virülans Faktör Genleri ve Antibiyotik Duyarlılık Profilleri Arasındaki İlişkinin Analizi	56
4.5. Enterokok Türleri ve Antibiyotik Duyarlılık Profilleri Arasındaki İlişkinin Analizi	58
4.6. Enterokok Türleri ve Virülans Faktör Genleri Arasındaki İlişkinin Analizi	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
6. KAYNAKLAR	67
7. ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
AME	Aminoglikozit Modifiye Edici Enzimler
Asa	Agregasyon Substansı
Bç	Baz Çifti
BHI	Beyin Kalp İnfüzyon
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
Cyl	Sitolizin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
<i>ebp</i>	Endokardit ve Biyofilm ile ilişkili Pilus
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EfaA	Endokardit-özgül Antijen A
Esp	Enterokokal Yüzey Proteini
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
Fsr	Fekal Streptokok Düzenleyici
GeLE	Jelatinaz
GEN	Gentamisin
HLAR	Yüksek Düzey Aminoglikozit Direnci
Hly	Hemolizin
Hyl	Hiyalüronidaz
LiaF	Lipit II Döngüsü Antibiyotik Direnç Proteini
MgCl₂	Magnezyum Klorür
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MSCRAMM	Yapışkan Matris Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri
NaCl	Sodyum Klorür
OM	Dış Membran
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
PAI	Patojenite Adası
PBP	Penisilin Bağlayıcı Proteinler

PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforez
PYR	L-Pirolidonil- β -Nafilamid
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
SagA	Salgılanan Antijen A
SrtC	Sortaz C
SrtA	Sortaz A
TBE	Tris-Borat-EDTA Tamponu
ÜSE	Üriner Sistem Enfeksiyonu
VRE	Vankomisine Dirençli Enterokoklar



ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa
Şekil 1. Enterokok türlerinin filogenetik ilişkilerini gösteren 16S rRNA gen dizilimlerine dayalı dendrogram.	6
Şekil 2. Enterokok hücre duvarının yapısal organizasyonu.	9
Şekil 3. Enterokokların patogenezinde rol oynayan virülans mekanizmaları	11
Şekil 4. Biyofilm oluşum aşamaları	17
Şekil 5. <i>Enterococcus</i> genusuna özgü PZR amplifikasyonlarının agaroz jel elektroforez sonuçları.	53
Şekil 6. <i>E. durans</i> (295 bç) ve <i>E. faecalis</i> (360 bç) türlerine ait PZR bant paternleri.	53
Şekil 7. Enterokok izolatlarının <i>asa1</i> , <i>ace</i> , <i>hyl</i> ve <i>cylA</i> virülans faktör gen bölgelerine ait PZR bant paternleri.	54
Şekil 8. Enterokok izolatlarının <i>esp</i> , <i>gelE</i> ve <i>ebp</i> virülans faktör gen bölgelerine ait PZR bant paternleri.	55
Şekil 9. Enterokok izolatlarının <i>efaA</i> virülans faktör gen bölgesine ait PZR bant paternleri.	55

TABLolar DİZİNİ	Sayfa
Tablo 1. Enterokokların sınıflandırılması.	5
Tablo 2. Enterokoklarda bulunan önemli virülans faktörleri.	12
Tablo 3. Fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı enterokok türlerinin ayırıcı tanısı.	26
Tablo 4. EUCAST kriterlerine göre enterokok izolatlarında antibiyotik duyarlılık sınır değerleri.	40
Tablo 5. Enterokok türlerinin belirlenmesi için PZR amplifikasyonunda kullanılan primer dizi çiftleri	42
Tablo 6. <i>Enterococcus</i> türüne özgü gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla her bir örnek için oluşturulan reaksiyon karışımı.	43
Tablo 7. <i>E.faecalis</i> , <i>E.durans</i> , <i>E.faecium</i> ve <i>E.gallinarum</i> türlerine özgü gen bölgelerinin amplifikasyonu amacıyla her bir örnek için oluşturulan reaksiyon karışımı.	43
Tablo 8. <i>Enterococcus</i> türüne özgü gen bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan sıcaklık ve süreleri.	44
Tablo 9. <i>E.faecalis</i> , <i>E.durans</i> , <i>E.faecium</i> ve <i>E.gallinarum</i> türlerine özgü gen bölgelerinin amplifikasyonu için uygulanan sıcaklık ve süreleri.	44
Tablo 10. <i>Enterococcus</i> türlerine özgü virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan primerler ve bant uzunlukları	45
Tablo 11. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan multipleks PZR reaksiyon bileşenleri (PZR Mix 1).	46
Tablo 12. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan multipleks PZR reaksiyon bileşenleri (PZR Mix 2).	47
Tablo 13. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan multipleks PZR reaksiyon bileşenleri (PZR Mix 3).	47
Tablo 14. <i>efaA</i> virülans gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları.	48
Tablo 15. Diğer virülans gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları.	49
Tablo 16. Hastaların Yaş, Cinsiyet ve Örnek Türüne Göre Dağılımı (n=99)	51

Tablo 17. Enterokok izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.	52
Tablo 18. Virülans faktör genleri ve antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel analizi.	57
Tablo 19. Enterokok türleri ve antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel analizi.	59
Tablo 20. Enterokok türleri ve virülans faktör genlerinin istatistiksel analizi.	60



ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok İzolatlarında Virülans Genlerinin Araştırılması

Enterokok türleri, toplum kökenli ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı patojenlerdir. Bu çalışmada, enterokok izolatlarının tür düzeyinde tanımlanması, antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi ve başlıca virülans genlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Kasım 2023–Nisan 2024 tarihleri arasında Kafkas Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen toplam 99 enterokok izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Tür tayini ve virülans gen analizi multiplex PZR ile, antibiyotik duyarlılık testleri ise Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. İzolatların %53,5'i (n=53) *E. faecalis*, %35,4'ü (n=35) *E. durans*, %11,1'i (n=11) ise diğer enterokok türleri olarak belirlenmiştir. Virülans genleri arasında en sık saptananlar *efaA* (%52,5/n=52), *esp* (%51,5/n=51), *ace* (%50,5/n=50), *asaI* (%43,4/n=43), *ebp* (%42,4/n=42), *gelE* (%33,3/n=33), *cylA* (%16,2/n=16) ve *hyl* (%13,1/n=13) olmuştur. İzolatların %84,8'inde (n=84) en az bir, %70,7'sinde (n=70) ise birden fazla virülans gen saptanmıştır. *esp* (p=0,032), *ebp* (p=0,002), *gelE* (p=0,002), *ace* ((p<0,001), *cylA* (p=0,002), *asaI* (p=0,003) ve *efaA* ((p<0,001)) genlerinin türlere göre dağılımlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılığı en yüksek teikoplanin ve vankomisine (%92,9), linezolid (%88,9) ve gentamisine (%82,8) karşı gözlenirken; en yüksek direnç siprofloksasin (%52,9), ampisilin (%43,4), fosfomisin (%34,2) ve nitrofurantoin (%31,4)'e karşı saptanmıştır. Ayrıca, ampisilin ve imipenem duyarlılığı *E. faecalis*'te *E. durans*'a kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p<0,05). Sonuç olarak, bu çalışma enterokok türlerinin virülans gen profillerinin yalnızca patojenite değil, antibiyotik direnç gelişiminde de kritik rol oynadığını ortaya koymakta ve elde edilen bulgular ise bölgesel antibiyotik direnç takibine önemli katkılar sunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Enterococcus*, Nozokomiyal Enfeksiyonlar, Virülans Genleri, Antibiyotik Direnci, Multipleks PZR.

SUMMARY

Investigation of Virulence Genes in *Enterococcus* Isolates Obtained from Clinical Samples

Enterococcus species are opportunistic pathogens that can cause both community-acquired and nosocomial infections. The aim of this study was to identify *Enterococcus* isolates at the species level, to assess their antibiotic susceptibility profiles, and to analyze the principal virulence genes by molecular methods. A total of 99 *Enterococcus* isolates obtained from clinical samples submitted to the Microbiology Laboratory of Kafkas University Hospital between November 2023 and April 2024 were included in the study. Species identification and virulence gene analysis were performed by multiplex PCR, while antibiotic susceptibility testing was carried out using the Kirby-Bauer disk diffusion method. Among the isolates, 53.5% (n=53) were identified as *E. faecalis*, 35.4% (n=35) as *E. durans*, and 11.1% (n=11) as other *Enterococcus* species. The most frequently detected virulence genes were *efaA* (52.5%; n=52), *esp* (51.5%; n=51), *ace* (50.5%; n=50), *asaI* (43.4%; n=43), *ebp* (42.4%; n=42), *gelE* (33.3%; n=33), *cylA* (16.2%; n=16), and *hyl* (13.1%; n=13). At least one virulence gene was found in 84.8% (n=84) of isolates, while 70.7% (n=70) harbored more than one. The distribution of *esp* (p=0.032), *ebp* (p=0.002), *gelE* (p=0.002), *ace* (p<0.001), *cylA* (p=0.002), *asaI* (p=0.003), and *efaA* (p<0.001) showed statistically significant differences among species. The highest antibiotic susceptibilities were observed against teicoplanin and vancomycin (92.9%), linezolid (88.9%), and gentamicin (82.8%), whereas the highest resistance rates were recorded for ciprofloxacin (52.9%), ampicillin (43.4%), fosfomycin (34.2%), and nitrofurantoin (31.4%). Furthermore, ampicillin and imipenem susceptibilities were significantly higher in *E. faecalis* compared to *E. durans* (p<0.05). In conclusion, this study demonstrates that virulence gene profiles of *Enterococcus* species play a critical role not only in pathogenicity but also in the development of antibiotic resistance. The findings provide valuable insights for regional antimicrobial resistance surveillance.

Keywords: *Enterococcus*, Nosocomial Infections, Virulence Genes, Antibiotic Resistance, Multiplex PCR

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Enterokoklar, hem insan hem de hayvan gastrointestinal sisteminin normal florasında yer alan bakterilerdir (Khan ve ark. 2022). Bununla birlikte, toprak, su, kanalizasyon ve bitkiler gibi çeşitli çevresel ortamlarda da yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardır (Braiek ve 2019). Uzun yıllar boyunca enterokok türlerinin insanlar için zararsız olduğu ve tıbbi açıdan önemsiz kabul edildiği düşünülmüştür (Fisher ve Phillips, 2009). Ancak yapılan araştırmalar, özellikle bağırsak mikrobiyotası bozulan, antibiyotik tedavisi gören ve hastanede yatan bireylerde bu bakterilerin çeşitli ciddi enfeksiyonlara neden olabileceğini ortaya koymuştur (Fiore ve ark. 2019). Günümüzde enterokok türleri, özellikle üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) başta olmak üzere, bakteriyemi, karın içi enfeksiyonlar ve cerrahi yara enfeksiyonları gibi nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen etkenleri arasında yer almaktadır (Ramos ve ark. 2020). Ayrıca, karın içi apseler, endokardit, menenjit, yumuşak doku enfeksiyonları ile nadiren de olsa kemik ve eklem enfeksiyonlarına neden olabildikleri bildirilmektedir (Yıldırım 2015). Enterokok türleri, hastane kökenli bakteriyemilerde genellikle üçüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarında ise ikinci sıklıkta izole edilen patojenlerdir (Khan ve ark. 2022). Enterokok cinsi, sağlıklı bireylerdeki toplam mikrobiyal yükün yaklaşık %1'ini oluşturan kommensal gastrointestinal bakteri türlerini kapsamakla birlikte, bazı türleri nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli patojenler arasında yer almaktadır (Krause ve ark. 2022). Enterokoklar, *Staphylococcus aureus* veya *Streptococcus pyogenes* gibi diğer Gram pozitif patojenlerle karşılaştırıldığında, çok sayıda toksin üretme ya da belirgin inflamasyon ve doku hasarına neden olma potansiyeli açısından daha sınırlı bir virülans profiline sahiptir (Gaca ve Lemos, 2019).

Son yıllarda nozokomiyal enfeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen suşlarda, antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirilen direnç önemli ölçüde dikkat çekmektedir (Khan ve ark. 2022). Bu direnç, genetik materyal içeren kromozom ve plazmidlerin yatay transferi, transpozon kazanımı ve virülans faktörlerinin varlığı gibi mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir. (Upadhyaya ve ark. 2009). Virülans faktörleri, patojenin konakçı organizma içerisinde kolonizasyon, invazyon ve kalıcılık gibi

süreçlerde etkinliğini sürdürebilmesi için gerekli biyolojik moleküler yapılardır. (Genez 2021).

Son dönemlerde yapılan birçok çalışma, özellikle vankomisine dirençli ve çoklu ilaca dirençli enterokok suşlarında; antibiyotik direnç genleri ile virülans faktörlerinin kazanımı ve transferinde endişe verici bir artış olduğunu ortaya koymuştur (Braiek ve Smaoui 2019).

Bu çalışmada, Kafkas Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin çeşitli poliklinik ve servislerinden Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen enterokok izolatlarında, başta virülans faktörleri olmak üzere bu faktörlerin antimikrobiyal direnç ile ilişkisi araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

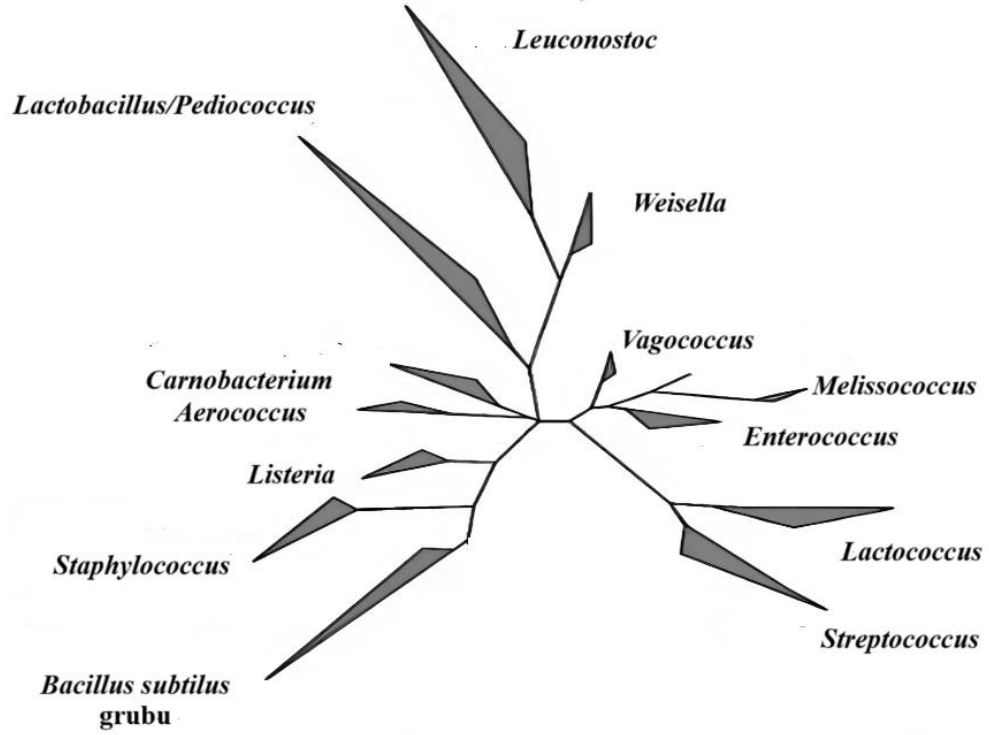
2.1.Tarihçe ve Sınıflandırma

"Enterokok" terimi ilk olarak Thiercelin tarafından 1899 yılında, bağırsak kökenli Gram pozitif diplokokları tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Baysal 2019). Bu mikroorganizma, daha sonra Andrewes ve Horder (1906) tarafından *Streptococcus* cinsine dâhil edilerek *Streptococcus faecalis* olarak sınıflandırılmıştır. Orla-Jensen'in (1919) tanımladığı ikinci bir dışkı kökenli organizma olan *Streptococcus faecium*'un da benzer özellikler taşıdığı belirlenmiştir. Sherman (1937), bu bakterileri *Streptococcus* cinsi içinde ayrı bir grup olarak değerlendirilmiş olsalar da, taksonomik konumları Kalina'nın 1970 yılına kadar yaptığı sınıflamaya kadar değişmeden kalmıştır. Bu süreçte organizmaların morfolojik ve biyolojik özellikleri ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Serolojik düzeydeki farklılıklar ise bu mikroorganizmaların *Enterococcus* adıyla ayrı bir cins olarak sınıflandırılması gerektiği görüşünü desteklemiştir (Svec ve Franz, 2014).

Enterokoklar, ilk kez yapılan Deoksiribonükleik Asit (DNA)–DNA ve DNA–Ribonükleik Asit (RNA) hibridizasyon çalışmaları sonucunda *Streptococcus* cinsinden ayrılarak, 1984 yılında bağımsız bir cins olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma, enterokokların diğer Gram pozitif koklar ve laktokoklardan genetik ve fenotipik olarak belirgin farklılıklar taşıdığını ortaya koymuştur. Bu ayrımı destekleyen bir diğer bulgu, 16S rRNA gen analizleriyle genetik düzeyde elde edilmiştir (Ayhan, 2021). Schleifer ve Kilpper-Balz (1984) ise enterokok bakterilerinin patojenik ve genetik özelliklerini dikkate alarak *Enterococcus* cinsi altında yeniden sınıflandırmıştır (Yıldırım, 2015; Fiore ve ark., 2019).

Tablo 1. Enterokokların sınıflandırılması (Akçimen 2010; Yıldırım 2015).

Şube	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Lactobacillales</i>
Aile	<i>Enterococcaceae</i>
Cins	<i>Enterococcus</i>



Şekil 1. Enterokok türlerinin filogenetik ilişkilerini gösteren 16S rRNA gen dizilimlerine dayalı dendrogram (Baysal 2019).

Enterokoklar, 50'den fazla türü içeren ve yüksek çeşitlilik gösteren bir taksonomik grup olarak tanımlanmaktadır (Fiore ve ark., 2022). Memelilerin gastrointestinal sistemlerinde en yaygın bulunan enterokok türleri arasında *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Enterococcus durans* (*E. durans*) ve *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) yer almaktadır (Muriqi, 2016).

Enterokok cinsi bakteriler, biyokimyasal özelliklerine göre beş gruba ayrılmaktadır:

Grup I: Sorboz, sorbitol ve mannitol içeren besiyerlerinde asit oluşturabilen, ancak arjinini hidrolize edemeyen bakterilerden oluşmaktadır. Bu grupta *Enterococcus avium*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus pallens*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* ve *Enterococcus saccharolyticus* yer almaktadır (Ada, 2019; Muriqi, 2016).

Grup II: Sorbozdan asit üretmeyen, sorbitol içeren besiyerinde değişken reaksiyon gösteren, mannitol içeren sıvı besiyerinde asit oluşturan ve arjinini hidrolize eden bakteriler bu grupta yer almaktadır. Grup II'de *Enterococcus gallinarum*,

Enterococcus faecalis, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus* ve *Enterococcus mundtii* bulunmaktadır (Akdemir, 2010; Ada, 2019).

Grup III: Sorboz, sorbitol ve mannitol içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmayan, arjinini hidrolize eden ve D antijeni içermeyen bakterilerden oluşmaktadır. Grup II’de yer alan *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin mannitol negatif varyantları da bu gruba dahil edilmiştir (Ada, 2019; Muriqi, 2016).

Grup IV: Sorboz ve mannitol içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmayan ve arjinini hidrolize edemeyen bakteriler bu grupta yer alır. Sorbitol içeren besiyerinde ise *Enterococcus cecorum* asit oluşturabilirken, *Enterococcus sulfureus* oluşturmaz. Grup IV bakterileri arasında *Enterococcus sulfurens*, *Enterococcus asini*, *Enterococcus phoeniculcola* ve *Enterococcus cecorum* bulunmaktadır (Çağaşar, 2010; Yıldırım, 2015).

Grup V: Sorboz içeren sıvı besiyerinde asit oluşturmayan, sorbitol içeren besiyerindeki reaksiyonları değişken olan, mannitol içeren sıvı besiyerinde asit oluşturan ve arjinini hidrolize edemeyen bakterilerden oluşmaktadır. Bu grupta *Enterococcus canis*, *Enterococcus columbae* ve *Enterococcus moraviensis* yer almaktadır (Muriqi, 2016).

2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

2.2.1. Boyanma Özellikleri

Enterokoklar, Gram pozitif boyanma özelliği gösteren ve morfolojik olarak kok ya da kokobasil formunda bulunan bakteriler olup, genellikle tekli, ikili veya kısa zincirler hâlinde gözlemlenirler (Svec ve Franz, 2014). Fakültatif anaerob karakterde olan bu mikroorganizmalar, mikroskopik olarak streptokoklardan ayırt edilemezler. Katı besiyerlerinde genellikle tekli veya ikili hücreler şeklinde görülürken, sıvı besiyerlerinde zincirler oluşturarak gelişirler (Murray ve Rosenthal, 2023). Hemolitik özellikleri, kullanılan kan türüne bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. At, tavşan ve insan kanlı agarlarda beta-hemoliz oluştururken, koyun kanlı agarda alfa hemoliz veya hemoliz göstermeme (non-hemolitik) şeklinde bir profil sergileyebilirler (Yıldırım, 2015).

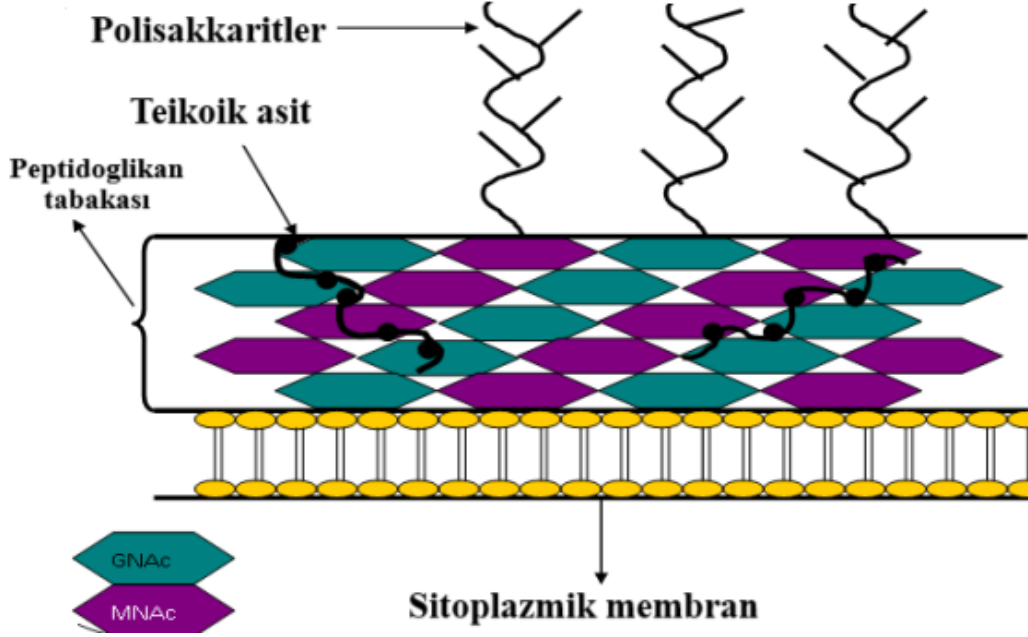
2.2.2. Üreme ve Fizyolojik Özellikleri

Enterokoklar, konak organizmanın savunma mekanizmalarına karşı direnç gösterebilme, bağırsak mikrobiyotasındaki rekabete dayanma ve hem doğal çevre hem de hastane koşulları gibi farklı ortamlarda varlıklarını sürdürebilme yetenekleri ile yeni konaklarda kolonizasyon kapasiteleri açısından önemli özellikler sergileyen mikroorganizmalardır. Bu adaptif yetenekler arasında, geniş bir sıcaklık ve pH aralığında büyüyebilme ile %6,5 sodyum klorür (NaCl) ve %40 safra tuzu içeren zorlayıcı ortamlarda gelişim gösterebilme bulunmaktadır (Hollenbeck ve Rice, 2012; Fiore ve ark., 2019). Enterokokları streptokoklardan ayıran temel özellikler arasında; 60°C’de 30 dakika süreyle uygulanan ısıtma işlemine dayanıklılık göstermeleri, %40 safra tuzu içeren besiyerlerinde çoğalabilmeleri ve eskulin hidrolizini gerçekleştirebilmeleri bulunmaktadır (Braiek ve Smaoui, 2019). Kanlı agar besiyerinde gri renkli ve parlak görünümlü koloniler meydana getirirken, hemolitik aktiviteleri alfa, beta veya gama şeklinde değişiklik gösterebilir (Yıldırım, 2007). Enterokok kültürlerinde Beyin Kalp İnfüzyon (BHI) agar ve kan içeren agarlar yaygın olarak kullanılmakta olup, izolasyonda sodyum azid ve safra eskulin en sık tercih edilen seçici ajanlardır (Svec ve Franz, 2014). Seçici izolasyon amacıyla Kanamisin Eskulin Azid Agar, Sitrat Azid Tween Karbonat Agar, Slanetz ve Bartley besiyeri, Thallous İyodür Asetat Tetrazolyum Glikoz Agar, *Streptococcus* Seçici Agar ve Kristal Mor Azid Agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır (Klein, 2003).

2.2.3. Hücre Duvarı ve Antijenik Yapısı

Enterokokların hücre duvarı, peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritler olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır (Muriqi, 2016). Gram negatif bakterilere özgü olan ve Gram pozitif bakterilerde bulunmayan dış membran (OM), hücre duvarının en dış katmanıdır. OM, çift lipit tabakasına sahip olmasına rağmen fosfolipit çift tabakası içermemektedir (Silhavy ve ark., 2010). Peptidoglikan polimerleri, glikan zincirleri ile bu zincirlere kovalent bağlı olan L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin ve D-alanin pentapeptitlerinden oluşmaktadır. Pentapeptitler, komşu peptitlerle çapraz bağlar oluşturarak hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlamaktadır ve bu yapı, enterokok hücre duvarının yaklaşık %40’ını oluşturmaktadır (Yıldırım, 2015). Peptidoglikan katmanları arasında, başlıca gliserol fosfat, glukosil

fosfat veya ribitol fosfat birimlerinin tekrarlanmasıyla oluşan teikoik asitler yer almaktadır. Bu uzun zincirli anyonik polimerlerin bir türü olan duvar teikoik asitleri, peptidoglikan yapısına kovalent bağlarla bağlı iken; lipoteikoik asitler, hücre membranındaki lipid baş gruplarına bağlanmaktadır (Silhavy ve ark., 2010).



Şekil 2. Enterokok hücre duvarının yapısal organizasyonu (Yıldırım 2015).

GNAc: *N-Asetilglukozamin*, **MNAc:** *N-Asetilmuramik Asit*

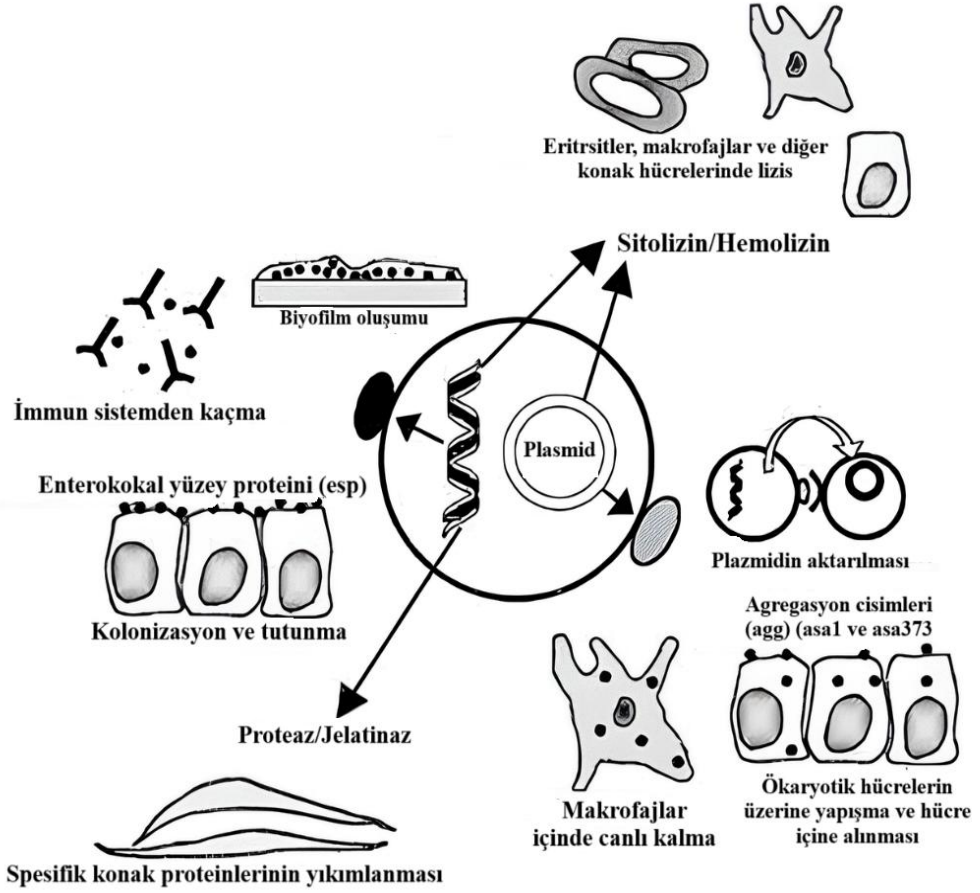
2.3. Patojenite

Enterokoklar, doğada yaygın olarak bulunan bakterilerdir ve hem komensal mikroorganizmalar hem de fırsatçı patojenler olarak işlev görebilmektedirler (Rosvoll, 2012). Bu çift yönlü yaşam biçimi, enterokokların farklı ve yoğun seçici baskıların bulunduğu çeşitli mikroortamlara uyum sağlamasını zorunlu kılmaktadır (Prieto ve ark., 2016).

Enterokoklara ait virülans faktörleri, suşların patojenik potansiyelini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır (Braiek ve Smaoui, 2019). Bu faktörler, bakterilerin konağa tutunmasını, invazyonunu ve enfeksiyon oluşturma yeteneğini sağlayan moleküler yapılardır. Bazı virülans genleri, patojenite ada (PAI)'ları veya plazmidler üzerinde kodlanmaktadır (Marques ve ark., 2023). PAI'ler, bakterilere

virülans özellikleri kazandıran büyük genetik elementler olup, yatay gen transferi yoluyla kazanılabilirler. Yaklaşık 150 kb büyüklüğünde olan bu adalar, 129 açık okuma çerçevesi (ORF) içermekte ve %32,2 oranında G+C içeriğine sahip bulunmaktadır. Ayrıca transpozazlar, transkripsiyonel düzenleyici proteinler ve virülansa katkı sağladığı bilinen çeşitli proteinleri kodlayan genler de bu bölgelerde bulunmaktadır (Solache ve Rice, 2019; Upadhyaya ve ark., 2009). Enterokokların komensal yaşam biçiminden saparak patojen hale gelmesinde, konak savunma mekanizmalarını aşmalarını ve yeni ekolojik nişlere adapte olmalarını mümkün kılan yeni genetik özelliklerin kazanımı önemli bir rol oynamaktadır (Tendolkar ve ark., 2003).

Enterokokların hastalık oluşturabilmesi için öncelikle çeşitli konak bariyerlerini aşmaları gerekmektedir. Bu süreçte ilk engel, mide asidi ve safra gibi konak savunma mekanizmalarının yanı sıra, yerleşik mikrobiyal flora tarafından sağlanan kolonizasyon direncidir. Enterokoklar, bu savunmaları etkili bir şekilde aşarak gastrointestinal sistemi kolonize etme yeteneği gösterebilmelidir (Fiore et al., 2019; Podbielska et al., 2011). Doku invazyonu sırasında ise, kolonizasyon bölgelerine kıyasla daha yüksek redoks potansiyeli, sınırlı besin kaynakları, fagositik lökositler ve diğer konak savunma unsurları gibi olumsuz koşullara maruz kalmaktadırlar (Selleck ve ark., 2019).



Şekil 3. Enterokokların patogenezinde rol oynayan virülans mekanizmaları (Ada 2019).

En yüksek virülans potansiyeline sahip enterokok türleri, çoğunlukla klinik örneklerden izole edilmekte olup; bunu sırasıyla gıda kaynaklı izolatlar ve çevresel suşlar izlemektedir. Enterokokların virülansı, çeşitli mikrobiyal özelliklerin etkileşimine bağlı olarak şekillenmektedir. Bu özellikler arasında, gastrointestinal sistem gibi primer kolonizasyon bölgelerinde kalıcı olarak bulunabilme kapasitesi; trombospondin, laktoferrin ve vitronektin gibi ekstraselüler matriks proteinleriyle moleküler düzeyde etkileşim kurabilme özelliği ile üriner sistem, ağız mukozası ve insan embriyonik böbrek hücreleri gibi konak epitel yüzeylerine sıkı şekilde bağlanabilme potansiyeli öne çıkmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009). Konak dokulara uyum sağlama mekanizmalarının, enterokokların ÜSE ve endokardit gibi ciddi klinik tablolardaki patogenezinde belirleyici bir rol oynadığı bildirilmektedir (Montealegre, 2016). Bu bakteriler, bağırsak epitel bariyerini aşarak endojen kaynaklı enfeksiyonlara

neden olmakta ve ardından lenf düğümleri aracılığıyla sistemik yayılım gösterebilmektedir (Baysal, 2019).

2.4. Virülans Faktörleri

Enterokokların tedavisini güçleştiren başlıca etkenlerden biri, yalnızca çoklu antibiyotik direnç mekanizmalarına sahip olmaları değil, aynı zamanda çeşitli virülans faktörleri aracılığıyla konak bağışıklık sisteminden etkin bir şekilde kaçabilmeleridir (Arias ve Murray, 2012; Kristich ve ark., 2014). Virülans faktörleri; enterokokların patojenitesini şekillendiren, enfeksiyon sürecinde bakterinin konak hücrelere adezyonunu, doku invazyonunu, bağışıklık yanıtından kaçışını ve biyofilm formasyonunu mümkün kılan yapısal ve fonksiyonel özellikleri ifade etmektedir (Sava ve ark., 2010; Garsin ve Frank, 2021). Tablo 2’de enterokok türlerine ait başlıca virülans faktörleri yer almaktadır.

Tablo 2. Enterokok türlerinde bulunan önemli virülans faktörleri.

Ekstraselüler Faktörler	Hemolizin/Sitolizin (Hly/Cyl)
	Salgılanan Antijen A (SagA)
	Jelatinaz (GelE)
	Hiyalüronidaz (Hyl)
	Seks Feromonları
Hücre Yüzeyine Bağlı Faktörler	Enterokokal yüzey proteini (Esp)
	Agregasyon faktörleri (Asa1, Asc10)
	MSCRAMM'ler (Ace, Acm ve Scm)
	Kollajen bağlayıcı proteinler (Ace, Acm)
	Endokardit-özgül Antijen A (EfaA)
	Endokardit ve biyofilm ile ilişkili pilus (<i>ebpABC</i> operonu, Bee, Pgc1-4)

2.4.1. Ekstraselüler Faktörler

2.4.1.1. Hemolizin/Sitolizin

Sitolizin (Cyl- β -hemolizin), enterokok türlerinde virülansın önemli bir belirleyicisi olan bakteriyosin sınıfı bir peptidik toksindir. Bu molekül, feromon duyarlı plazmidler üzerinde ya da kromozomal PAI'lerde kodlanmaktadır (Krawczyk ve ark. 2021). Sitolizin gen ekspresyonunun, hücre yoğunluğuna duyarlı bir *quorum sensing* mekanizması aracılığıyla düzenlendiği ve bu sürecin, iki bileşenli bir sinyal transdüksiyon sistemi tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. (Tendolkar ve ark. 2003).

Sitolizin, enterokok cinsinde en kapsamlı biçimde incelenen virülans faktörlerinden biri olup, hedef bakteriyel hücrelerin sitoplazmik membranında porlar oluşturarak hücre lizisine neden olmaktadır (Braiek ve Smaoui, 2019). *E. faecalis*'in sitolitik özellik göstermeyen mutant suşlarının hemolitik aktivite açısından karşılaştırılması sonucunda, sitolizinin yapısal olarak bir aktivatör bileşen ile litik etkili bir alt birimden oluştuğu ortaya konmuştur (Gilmore ve ark., 2014).

Laboratuvar koşullarında sitolizin üretimi, %5 at kanı ile zenginleştirilmiş ve taze hazırlanmış sığır kalbi infüzyon agar üzerine enterokok suşlarının inokülasyonu ile değerlendirilmektedir. Koloni çevresinde oluşan belirgin β -hemoliz zonu, sitolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmekte ve bu durum pozitif sonuç olarak yorumlanmaktadır (Upadhyaya ve ark., 2009).

Sitolizin üretiminden sorumlu gen kümesi; *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *cylI* genlerinden oluşmakta olup, bu genlerin koordineli ekspresyonu, “çekirdek algılama” (core sensing) olarak adlandırılan bir sinyal iletim sistemi aracılığıyla düzenlenmektedir (Muriqi, 2016).

Hemolizin üreten enterokok suşlarının, hem deneysel hayvan modellerinde hem de insanlarda enfeksiyonun şiddetini artırdığı ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Upadhyaya ve ark., 2009). Öte yandan, sitolizin yalnızca bir sitotoksin olarak değil, aynı zamanda çeşitli yararlı işlevleri de yerine getirebilen çok yönlü bir molekül olarak değerlendirilmektedir. Bu işlevler arasında; konak dokulara kolonizasyonu kolaylaştırma, daha patojenik ajanlara (örneğin bağırsak parazitlerine) karşı savunma sağlama, farklı kaynaklardan besin alımını destekleme ve popülasyon

yoğunluğunu algılamaya yönelik bir sinyal molekülü olarak görev yapma yer almaktadır (Asif ve Ali, 2019).

2.4.1.2. Salgılanan Antijen A

Salgılanan Antijen A (SagA), *E. faecalis*'te bulunan ve bakterinin enfektivite ile adezyon kapasitesini artıran önemli bir virülans faktörüdür. Hücre duvarına bağlı bir protein olan SagA, bakterinin konak epitel hücrelerine tutunmasını kolaylaştırmakta ve immün yanıtı desteklemektedir (Van Tyne ve ark., 2013). SagA proteininin sentezinden sorumlu *sagA* geni, invaziv enterokok suşlarında sıklıkla tespit edilmekte olup özellikle endokardit ve kateter ilişkili enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (Singh ve ark., 2021). Ayrıca, biyofilm oluşum sürecinde *sagA* geninin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu durum, SagA'nın kronik ve tedaviye dirençli enfeksiyonlarda da önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Arias ve Murray, 2012).

2.4.1.3. Jelatinaz

Enterokoklar tarafından üretilen bu proteaz, jelatin, kollajen, kazein, hemoglobin ve çeşitli peptitleri hidrolize edebilme kapasitesine sahiptir (Upadhyaya ve ark., 2009). *E. faecalis*'te karakterize edilen bu matriks metaloproteinaz, jelatinaz enzimini kodlayan *gelE* geni tarafından ifade edilmektedir. Bu enzimin yalnızca kompleman aracılı bağışıklık yanıtını modüle etmekle kalmayıp, aynı zamanda *E. faecalis* kaynaklı enfektif endokardit patogenezi de katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Geraldine ve ark., 2022).

E. faecalis genomunda tanımlanan 17 adet iki bileşenli sistem arasında yer alan fekal streptokok düzenleyici (Fsr) sistemi, en kapsamlı şekilde incelenmiş olanlardan biridir ve enterokokal virülansla güçlü bir ilişki göstermektedir. *Fsr* lokusu; *FsrA*, *FsrB*, *FsrC* ve *FsrD* genlerini içermektedir. Bu sistem, hücre dışı jelatinaz biyosentezini indükleyen bir sinyal feromonu olan jelatinaz biyosentezini aktive eden feromon (GBAP) birikimine yanıt vermektedir. *FsrB*, *FsrD* peptidinin işlenmesinden sorumlu, sistein içeren ve proteaz benzeri aktiviteye sahip bir enzimdir. Hücre dışı ortamda *FsrD*'nin birikimi, *FsrC* tarafından algılanmakta ve bunun sonucunda yanıt düzenleyici transkripsiyon faktörü *FsrA* aktive edilmektedir. *FsrC*'nin kimyasal olarak sentezlenmiş peptidi ile uyarılabildiği, hem *in vivo* hem de *in vitro* deneysel

çalışmalarla gösterilmiştir. *FsrABDC* proteinleri, *gelE* geninin yukarı akışında yer alan bir promotörü hedef alarak, *E. faecalis* virülansı ile ilişkili iki önemli proteaz olan GelE ve SprE'nin ekspresyonunda kilit bir rol oynamaktadır (Zhang ve ark., 2023; Sangiorgio ve ark., 2024).

2.4.1.4. Hiyalüronidaz

Hiyalüronidazlar, hiyalüronatı parçalayabilme yeteneğine sahip bakteriyel enzimler olup, özellikle mukozal yüzeylerde ve deride enfeksiyon başlatma potansiyeli taşıyan çeşitli Gram pozitif patojenler tarafından salgılanmaktadır (Podbielska ve ark., 2011). Bu enzim, bağ dokusunun temel bileşenlerinden biri olan hiyalüronik asidi parçalayarak dokuda dejeneratif değişikliklere neden olabilmektedir (Akçimen, 2010). Ayrıca, bazı hiyalüronidazların daha düşük etkinlik düzeyinde de olsa kondroitin sülfat gibi diğer glikozaminoglikanları da hedef alabildiği bildirilmiştir (Ada, 2019).

Bu enzimler, ekstraselüler matriks içerisinde yer alan mukopolisakkarit yapıların depolimerizasyonunu sağlayarak, bakterilerin konak dokular arasında yayılımını kolaylaştırır. Ayrıca, hiyalüronik asidin yıkımı sonucunda açığa çıkan disakkarit ürünler, mikroorganizmalar için potansiyel bir karbon kaynağı oluşturarak mikrobiyal proliferasyonu destekleyebilmektedir (Akçimen, 2010).

Hiyalüronat; göbek kordonu, sinovyal sıvı, kıkırdak, beyin, kas dokusu ve diğer bağ dokularında yaygın olarak bulunur. Vücutta bulunan toplam hiyalüronat miktarının yaklaşık yarısının deri dokusunda yer aldığı bildirilmektedir (Asif ve Ali, 2019). Dişin dentin tabakasında da bulunan hiyalüronik asit, *E. faecalis* tarafından salgılanan hiyalüronidaz enzimi aracılığıyla parçalanarak, bakterinin kök kanalı boyunca periapikal bölgelere ilerlemesini kolaylaştırmaktadır. Bu durum, enterokokların diş kaynaklı enfeksiyonlarda ve çevre dokulara yayılımda rol oynamasına katkı sağlamaktadır (Genez, 2021). Ayrıca, *E. faecalis*'in birçok dezenfektan ve antiseptiğe karşı gösterdiği direnç, kök kanal tedavisinde karşılaşılan başarısızlıkların başlıca nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Fiore ve ark., 2019).

2.4.1.5. Seks Feromonları

E. faecalis'te donör ve alıcı hücrelerin kümelenmesi ile plazmidlerin konjugatif transferinin, alıcı hücreler tarafından salgılanan ve plazmid taşıyan donör hücreler tarafından algılanan düşük moleküler ağırlıklı sinyal molekülleri aracılığıyla indüklendiği bildirilmiştir. Bu sinyal moleküllerinin, donör hücreler arasındaki iletişimi sağlayan bakteriyel cinsiyet feromonları olarak işlev gördüğü öne sürülmektedir (Dunny ve Berntsson, 2016). Biyolojik olarak aktif bu molekül, başlangıçta hücre kümelenmesini indükleyen bir ajan olarak tanımlanmış, ancak daha sonra aynı türün farklı bireylerinde çiftleşme yanıtını tetikleyen bir sinyal molekülü olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, kümelenmeyi indükleyen bu ajanın bakteriyel cinsiyet feromonu olarak işlev gördüğü kabul edilmektedir. Seks feromonlarına aracılık ettiği ilk kez gösterilen konjugatif plazmidlerin ise bakteriyosin ve hemolizin üretimini kodladığı, ancak antibiyotik direnç genleri taşımadığı bildirilmiştir (Clewell ve ark., 2002).

2.4.2. Hücre Yüzeyine Bağlı Faktörler

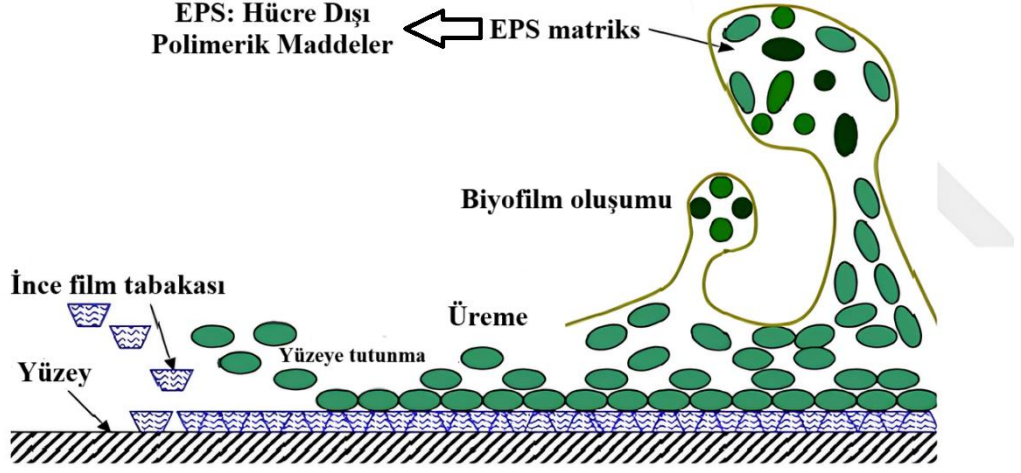
2.4.2.1. Enterokokal Yüzey Proteini

Enterokokal yüzey proteinleri (Esp), *E. faecalis* ve *E. faecium* gibi enterokok türlerinde tanımlanmış olup, ilk kez yüksek düzeyde virülan ve gentamisine dirençli bir *E. faecalis* izolatında, bakteriyemiye neden olan bir klinik örnekte karakterize edilmiştir (Tendolkar ve ark., 2003). Esp proteinleri; hücreler arası adezyon, özellikle ökaryotik hücrelere tutunma ve konak bağışıklık yanıtından kaçışla ilişkili başlıca virülans faktörleri arasında yer almaktadır (Braiek ve Smaoui, 2019).

Esp, ÜSE'nda kolonizasyon ve persistens ile ilişkili bir adezin olarak görev yapmakta ve aynı zamanda biyofilm oluşumu ile antimikrobiyal direnç gelişiminde kritik bir rol üstlenmektedir (Marques ve ark., 2023). Biyofilm oluşum mekanizması şekil 4. de verilmiştir. Bu proteinler, bakterinin konak hücrelere tutunmasını kolaylaştırarak enfeksiyon oluşturma potansiyelini artırmakta ve biyofilm yapısını destekleyerek antibiyotik direncine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Fisher ve Phillips, 2009).

Esp proteinleri, *E. faecalis*'in polistiren yüzeyler, kateterler, protez kalp kapakçıkları, ortopedik implantlar, yapay kalp pilleri, üreteral stentler ve intravasküler

kateterler gibi çeşitli hastane kaynaklı tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşturmasıyla ilişkilendirilmiştir (Mohamed ve Huang, 2007).



Şekil 4. Biyofilm oluşum aşamaları (Genez 2021).

2.4.2.2. Agregasyon Faktörleri

Agregasyon maddeleri (Agg olarak da adlandırılır), *E.faecalis* suşlarında feromon sinyali aracılığıyla indüklenen ve hücre yüzeyinde bulunan proteinlerdir (Sava ve ark. 2010). Bu proteinler, bakterinin epitel hücrelere adezyonunu kolaylaştırmakta ve konak dokular üzerinde kolonizasyon yeteneğini artırmaktadır. İn vitro çalışmalarda, *E. faecalis*'in renal tübüler hücrelere adezyon gösterdiği ve insan bağırsak epitel hücrelerinde kolonizasyon kapasitesinin anlamlı düzeyde arttığı gösterilmiştir (Tendolkar 2003).

Agregasyon faktörleri, özellikle bakteri konjugasyonu sırasında plazmid transferini kolaylaştıran yapılar olup, virülans genleri ile antibiyotik direnç genlerinin yayılımında önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüzey proteinleri, epitelyal hücrelere özgü bağlanma özellikleri sayesinde plazmidlerin alıcı hücrelere aktarımını desteklemekte ve böylece bakteri popülasyonu içerisinde genetik materyal değişimini mümkün kılmaktadır (Braieik ve Smaoui, 2019).

Bilinen ilk agregasyon protein grubu, üç ana adezini içermektedir: Asa1, Asc10 (aynı zamanda *PrgB* olarak da adlandırılır) ve Asa373. Bu proteinler sırasıyla konjugatif plazmitler *pPD1*, *pCF10* ve *pAD1* tarafından kodlanmakta olup, amino asit dizilimleri açısından yüksek düzeyde benzerlik sergilemektedir (Geraldde ve ark.,

2022). Feromonla indüklenebilir plazmidler tarafından kodlanan bu yüzey proteinleri, feromon sinyalinin algılanmasıyla birlikte bakteriyel yüzeyde eksprese edilmektedir. Agregasyon proteinlerinin yapısı; N-terminal çıkış sinyali, değişken bölge, agregasyondan sorumlu merkezi alan ve iki adet Arg-Gly-Asp (arjinin-glisin-aspartik asit) motifinden oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2023). Bu yapı, donör bakterinin yüzeyini alıcı hücrelerle etkileşime uygun hâle getirerek hücreler arası agregasyona neden olmakta ve gen transfer sürecini etkin biçimde desteklemektedir (Podbielska ve ark., 2011).

Agregasyon faktörlerinin, özellikle endokardit ve ÜSE’da belirgin bir virülans özelliği taşıdığı ve nozokomiyal *E. faecalis* suşlarında daha yüksek sıklıkta saptandığı gösterilmiştir (Genez, 2021).

2.4.2.3. Enterokok MSCRAMM'leri

İnsan dokularının kolonizasyonunun, hücre dışı matriste bulunan spesifik proteinler ile MSCRAMM'ler (yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri) arasındaki etkileşimler aracılığıyla gerçekleştiği varsayılmaktadır (Baylan, 2019). Şu ana kadar yedi enterokokal MSCRAMM ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir ve bunlar arasında *E. faecalis*'e özgü Ace (kollajene bağlanan protein), Fss1, Fss2 ve Fss3 (yüzey proteinleri) ile *E. faecium*'a ait Acm (kollajen bağlayıcı protein), Scm (ikinci kollajen adezini) ve EcbA (kollajen bağlayıcı protein A) yer almaktadır (Sava ve ark., 2010).

2.4.2.4. Kollajen Bağlayıcı Adezin/Protein

Ace, enterokoklarda kollajen bağlayıcı işlev gören bir MSCRAMM olup, yapısal ve fonksiyonel özellikleri bakımından stafilokokların kollajen bağlayıcı adezini olan Cna proteinine benzerlik göstermektedir (Tendolkar ve ark., 2003). Enterokoklarda tanımlanan üç ana MSCRAMM arasında Ace, Acm ve Scm yer almaktadır. Bu proteinlerden Ace, ilk keşfedilen MSCRAMM olup, onu sırasıyla Acm ve Scm izlemiştir. Ace, laminin ve dentin gibi ekstraselüler matris bileşenlerine bağlanabilme özelliğiyle öne çıkarken, Scm proteininin ayrıca fibrinojene bağlanabildiği gösterilmiştir (Geraldès ve ark., 2022; Krawczyk ve ark., 2021).

Kollajen bağlayıcı protein Cna, *cna* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu adezinin, özgün diziler içeren yaklaşık 55 kDa büyüklüğünde bir N-terminal A alanı ile 1 ila 4 tekrar içeren yaklaşık 25 kDa'lık bir B alanından oluştuğu bilinmektedir. Ayrıca C-terminal bölgesi, hücre duvarına bağlanmayı sağlayan hidrofobik bir transmembran segmentin yanı sıra, pozitif yüklü amino asit kalıntıları açısından zengin kısa bir sitoplazmik bölge içermektedir (Podbielska ve ark., 2011).

2.4.2.5. Endokardit-özgül Antijen A

EfaA, *E. faecalis*'in temel yüzey antijenlerinden biri olarak tanımlanmış olup özellikle *E. faecalis* kaynaklı endokardit vakalarına ait serum örneklerinde tespit edilmiştir (Baysal, 2019). Bu proteinin, stres yanıt mekanizmaları ve hücre büyümesinin yanı sıra hücre duvarı metabolizmasında da işlevsel bir rol üstlendiği öne sürülmektedir (Marques ve ark., 2023). *efaA* geni, üç gen içeren *efaBCA* operonunun üçüncü genidir ve bu operon, bir ABC taşıyıcı sisteminin bileşenlerini kodlamaktadır. EfaA'nın ise bu sistem içerisinde substrat bağlayıcı bir lipoprotein olarak görev yaptığı tahmin edilmektedir (Selleck ve ark., 2019).

2.4.2.6. Endokardit ve Biyofilm ile İlişkili Pilus

1980'li yıllarda Handley ve Jacob tarafından enterokoklar üzerinde gerçekleştirilen elektron mikroskobu incelemelerinde, pili veya fimbriya benzer filamentöz yapılar gözlemlenmiş olsa da, enterokokal pilusun genetik ve yapısal temeli ancak üç gen içeren *ebpABC* operonunun keşfiyle ortaya konabilmiştir (Gilmore ve ark., 2014). *ebp* lokusu, pilusun alt birimlerini kodlayan *ebpA*, *ebpB* ve *ebpC* genlerinin yanı sıra C sınıfı bir sortaz olan *bps* genini içeren bir operondan oluşmaktadır. Bu polisistronik gen kümesinin ekspresyonu, aşağı akışta konumlanan Sortaz C (SrtC) enzimi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir.

SrtC, pilus yapısının polimerizasyonunu sağlayan ve hücre duvarına bağlanmadan önce, Sortaz A (SrtA) tarafından tanınan LPXTG (lösin–prolin–X–treonin–glisin) motifine sahip proteinleri işleyen bir enzimdir. SrtA, hücre duvarı proteinlerinin C-terminal bölgesinde bulunan LPXTG motifini tanıyarak çeşitli virülans faktörlerinin hücre duvarına tutunmasını sağlamakta ve bu süreçte kritik rol oynamaktadır (Goh ve ark., 2017). *ebp* gen kümesinin, *E. faecalis*'in patojenitesine anlamlı düzeyde katkı sağladığı düşünülmektedir (Montealegre, 2016). Ayrıca, *E.*

faecalis ve *E. faecium* türlerinde adezyon benzeri endokardit antijenlerini kodlayan *efaAfs* ve *efaAfm* virülans genlerinin de endokardit gelişiminde rol oynadığı bildirilmektedir (Krawczyk ve ark., 2021).

2.5. Klinik Enfeksiyonlar

Enterokoklar, sağlıklı bireylerde genellikle ciddi bir sağlık sorunu oluşturmazken, nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkilendirilen fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedir. Bu özellikleri nedeniyle özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Kalfopoulou ve Huebner, 2020). Son yıllarda enterokokların neden olduğu enfeksiyonların sıklığında belirgin bir artış gözlenmekte olup, bu bakteriler nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ön sıralarda yer almaktadırlar. Tüm enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık %80–90'ından *E. faecalis*, %5–15'inden ise *E. faecium* sorumludur. Diğer türler arasında yer alan *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium* ve *E. raffinosus* klinik örneklerin yaklaşık %5'inden izole edilmektedir (Kandemir, 2012; Genez, 2021).

Enterokoklar, gelişmiş ülkelerde sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonların en yaygın etkenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bakteriyemi, enfektif endokardit, intra-abdominal ve pelvik komplikasyonlarının yanı sıra, cilt, yumuşak doku ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları gibi çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedir (Sangiorgio, 2024). Enterokok türleri nadiren otit, endoftalmit, osteomyelit, artrit, pnömoni, periodontit ve sinüzit gibi enfeksiyonlara da yol açabilmektedir. Bu tür nadir enfeksiyon olguları, enterokokların farklı klinik tablolar oluşturabilme kapasitesini ve bu mikroorganizmaların tedavi sürecindeki önemini ortaya koymaktadır (Genez, 2021).

Diğer patojen mikroorganizmalara kıyasla daha düşük mortalite oranlarına sahip olsa da, çevresel yüzeylerde uzun süre canlı kalabilmeleri nedeniyle nozokomiyal bulaş açısından önemli bir risk faktörüdürler. Özellikle enterokokal endokardit, cerrahi sonrası gelişen spondilodiskit ve yabancı cisimle ilişkili enfeksiyonlar gibi bazı klinik durumlar, tedavisi güç ve dirençli seyreden enterokokal enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (Mischink ve ark., 2019).

2.5.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

ÜSE, enterokokların en sık izole edildiği enfeksiyon türlerinden biridir ve özellikle idrar kültürlerinde yaygın olarak saptanmaktadır (Yıldırım, 2007). Bu enfeksiyonların büyük kısmı nozokomiyal kökenli olup, genellikle üriner kateterizasyon gibi invaziv işlemlerle ilişkilidir (Mutuku, 2012). Enterokok kaynaklı ÜSE'ler; komplike olmayan sistit, piyelonefrit, prostatit ve perinefrik apse gibi çeşitli klinik tablolarla ortaya çıkabilir. Yoğun bakım hastalarında etken dağılımı genel popülasyondan farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca yaş ile nozokomiyal enfeksiyonlar arasında anlamlı ilişki bulunduğu bildirilmektedir. İleri yaşta artan invaziv girişimler ve azalan immün fonksiyonlar, enterokokal ÜSE riskini yükseltmektedir (Çelik ve Alhan, 2008).

2.5.2. Endokardit

Enterokoklar, özellikle yaşlı bireylerde artan genitoüriner hastalıklar ve dejeneratif kalp rahatsızlıkları nedeniyle enfektif endokardit etkeni olarak önem kazanmaktadır (Çelik ve Alhan, 2008). Bakterisidal antibiyotiklere karşı doğal dirençleri, tedaviyi zorlaştırmakta, bu direnç duyarlı suşlarda bile tedavi başarısını düşürebilmektedir. Enfektif endokardit vakalarının %10–20'si enterokok kaynaklıdır (Fiore ve ark., 2019). Enfeksiyon sıklıkla aort ve mitral kapaklarda görülür, subakut seyirlidir ve genellikle genitoüriner kaynaklıdır; nadiren gastrointestinal patolojilerle de ilişkilidir (Mutuku, 2012; Kandemir, 2012).

Ampisilin ve gentamisin kombinasyonu, duyarlı *E. faecalis* olgularında ilk tercihtir; ampisilin-seftriakson ikilisi ise alternatif tedavi olarak önerilmektedir (Dubin ve Pamer, 2017).

2.5.3. Bakteriyemi

Enterokokal bakteriyemiler genellikle enterokokların bağırsak mukozasından kan dolaşımına translokasyonu ile ortaya çıkmakta; intravenöz kateterler, enfektif endokardit, ÜSE ve apseler gibi odaklar da önemli kaynaklar arasında yer almaktadır (Fiore ve ark., 2019). Polimikrobiyal bakteriyemiler ise, özellikle intra-abdominal enfeksiyon şüphesini destekleyici bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca,

cerrahi alan enfeksiyonları ve yanık yaraları da potansiyel kaynaklardır (Mutuku, 2012).

Enterokok türlerinden *E. faecalis*, endokardit gelişiminde öne çıkmakta ve bu durum, ileri yaşlı ya da immünsüprese bireylerde yüksek mortalite ile ilişkilendirilmektedir (Ada, 2019). Diğer yandan, *E. faecium* kaynaklı bakteriyemilerde eradikasyonun sağlanamaması, olumsuz klinik sonuçlarla anlamlı düzeyde ilişkilendirilmiştir (Khan ve ark., 2022).

Kalıcı bakteriyemi ile olumsuz klinik sonuçlar arasında güçlü bir ilişki gösterilmiştir. Ancak bu durumun nedensel mi yoksa enfeksiyon şiddeti ve zayıf bağışıklığın bir yansıması mı olduğu konusu belirsizliğini korumaktadır (Rogers ve Rice, 2023). Mukozal bağışıklığın bozulması ve gastrointestinal bariyerin zedelenmesi, enterokokal bakteriyemi için kritik risk faktörlerindedir. Özellikle mukozit, *Clostridium difficile* enfeksiyonu ve nötropeni gibi durumlar bu riski artırmaktadır (Dubin ve Pamer, 2017).

2.5.4. Karın İçi ve Pelvik Enfeksiyonları

Enterokoklar, gastrointestinal sistemin doğal florasında yer aldıkları için enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilmeleri klinik açıdan güçlük yaratabilmektedir. Özellikle diğer mikroorganizmalara yönelik tedaviye rağmen klinik iyileşme sağlanamaması ve kültürlerde enterokok üremesinin devam etmesi durumunda, bu etkenlere özgü antibiyotik tedavisine geçilmesi gerekmektedir (Kandemir, 2012). Enterokoklar; karın içi apse, bakteriyemi ve safra yolu enfeksiyonları gibi çeşitli klinik tabloların etkeni olabilir. Bu enfeksiyonlar genellikle ateş, karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal gibi semptomlarla seyretmekte, fizik muayenede abdominal hassasiyet ve rebound bulguları dikkat çekmektedir (Singh ve Khardori, 2012; Yıldırım, 2007).

2.5.5. Yara Ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Konak hücre yüzeylerine yapışma ve immün yanıtta kaçma sürecinin ardından, enterokokal enfeksiyonların patogenezindeki son aşama, konakta patolojik değişikliklerin meydana gelmesidir. Bu değişiklikler; konağın inflamatuvar yanıtı, enterokoklar tarafından salgılanan toksinler veya proteazların doğrudan etkisiyle oluşabileceği gibi, toksik metabolik yan ürünlerin birikimiyle de tetiklenebilmektedir (Fiore ve ark., 2019; Selleck ve ark., 2019). Enterokokların neden olduğu yara ve

yumuşak doku enfeksiyonları ise genellikle tek başına görülmemekte, çoğunlukla cerrahi yaralar, dekübit ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonları gibi klinik durumlarla birlikte ortaya çıkmaktadır (Akdemir, 2010; Genez, 2021).

2.5.6. Menenjit

Enterokok menenjiti, spontan olarak ya da cerrahi girişimler sonrasında her yaş grubunda görülebilmekle birlikte, nadir görülen bir klinik tablo olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda enterokoklara bağlı menenjit oranının genellikle % 0–3 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu vakaların büyük çoğunluğu bir yaş altındaki çocuklarda görülmektedir (Çelik ve Alhan, 2008). Menenjit, enterokokal bakteriyeminin bir sonucu olarak nadiren gelişmektedir; ancak görüldüğünde çoğunlukla yenidoğanlarda tanı almaktadır (Vu ve Varvalho, 2011).

2.6. Epidemiyoloji

Enterokok türleri; toprak, su, bitkiler, kuşlar, böcekler ve memeliler dahil olmak üzere çok çeşitli çevresel kaynaklarda doğal olarak yaygın şekilde bulunmaktadır (Selleck ve ark., 2019). Bu geniş habitat spektrumu, enterokokların pH, sıcaklık ve ozmotik basınç farklılıkları gibi değişken çevresel koşullara tolerans gösterebilmeleriyle ilişkilidir. Bu adaptif özellikleri sayesinde enterokoklar, insanlarda hem nozokomiyal hem de toplum kökenli endojen enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkabilmektedir (Goh ve ark., 2017).

Enfeksiyonların büyük bir kısmının polimikrobiyal yapıda olması, farklı bakteriyel türlerin konak dokular veya tıbbi cihazlar üzerinde oluşturduğu karma biyofilm yapıları aracılığıyla antibiyotik tedavisine ve çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı artan tolerans göstermeleriyle ilişkilendirilmektedir. 1980’li yıllardan itibaren yürütülen araştırmalar, enterokokların idrar yolu enfeksiyonları, kateter ilişkili enfeksiyonlar, yara enfeksiyonları, diyabetik yumuşak doku enfeksiyonları, kalp kapakçığı enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları ile intraabdominal ve pelvik enfeksiyonların etiyojisinde rol oynadığını ortaya koymuştur (Goh ve ark., 2017).

E. faecalis, diğer enterokok türleriyle karşılaştırıldığında insan dışkısından en sık izole edilen tür olarak öne çıkmaktadır. İkinci en yaygın tür olan *E. faecium* ise orofarenks, vajinal sekresyonlar ve özellikle perineal bölge cilt florasında yer alabilmektedir (Çağaşar, 2010). Bunun yanı sıra, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E.*

casseliflavus, *E. durans*, *E. hirae* ve *E. raffinosus* gibi daha nadir izole edilen enterokok türlerinin de insanlarda enfeksiyon etkeni olabileceği bildirilmektedir (Isnard, 2017).

Avrupa genelinde enterokok türlerinin dağılımı, ülkeler arasında belirgin bölgesel farklılıklar göstermektedir. İspanya ve Birleşik Krallık'ta *E. faecalis* ve *E. faecium*, hem klinik hem de çevresel örneklerden en sık izole edilen türlerdir. Buna karşılık, İsveç'te *E. faecium* prevalansı daha düşük düzeydeyken, *E. hirae* daha yaygın olarak tespit edilmektedir. Danimarka'da ise *E. hirae* baskın tür konumundadır ve sıklıkla kesim hayvanlarından izole edilmektedir (Fisher ve Phillips, 2009). Amerika Birleşik Devletleri'nde enterokoklar, 1970'li yıllardan itibaren nozokomiyal enfeksiyonların önemli etkenlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Bu dönemde enterokok enfeksiyonlarının %90–95'i *E. faecalis* kaynaklı iken, 1990'lı yıllardan itibaren *E. faecium* türü göreceli olarak daha sık izole edilmeye başlanmış ve günümüzde tüm enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık %38'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Montealegre, 2016).

2.7. İdentifikasyon

Enterokoklar, spor oluşturmayan, oval şekilli bakteriler olup tekli, çiftler halinde ya da kısa zincirler ve gruplar şeklinde bulunabilirler. Kemoorganotrofik ve fakültatif anaerob özellik gösteren bu mikroorganizmalar, homofermentatif metabolizma yoluyla karbonhidratları fermente ederek başlıca son ürün olarak laktik asit üretmektedirler (Solache ve Rice, 2019). Enterokoklar, genel olarak katalaz negatif olup tam gelişmiş bir sitokrom sistemine sahip değildir. Ancak bazı türler düşük düzeyde katalaz aktivitesi sergileyebilir ve zayıf efervesans ile katalaz pozitif olarak değerlendirilebilirler. Glikoz fermantasyonu sonucunda çoğunlukla yalnızca laktik asit üreten ve gaz oluşturmayan bu bakteriler arasında *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* gibi bazı türlerin hareketli olduğu bilinmektedir (Gilmore, 2014).

Biyokimyasal testler ve antibiyotik duyarlılık testleri gibi fenotipik tanı yöntemleri; sınırlı sayıda enterokok türünü ayırt edebilme, yüksek iş gücü ve maliyet gerektirme, ayrıca farklı özelliklerin ortaya konabilmesi için modifikasyon ihtiyacı duyma gibi çeşitli kısıtlılıklara sahiptir. Ayrıca bu yöntemlerin, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gibi moleküler tanı tekniklerine kıyasla duyarlılık düzeylerinin

genellikle daha düşük olduğu bildirilmektedir (Brown ve ark., 2006). Bununla birlikte, fenotipik yöntemler, moleküler tanımlamayı destekleyici tamamlayıcı araçlar olarak hâlen kullanılabilir (Ayhan, 2021). Nükleik asit amplifikasyonuna dayalı PZR yöntemi zaman ve maliyet açısından bazı dezavantajlara sahip olsa da, enterokokların virülans faktörlerinin tanımlanmasında fenotipik yöntemlere kıyasla üstün duyarlılık, hız ve biyogüvenlik düzeyi sağlamaktadır. Ayrıca, PZR'nin birden fazla enterokok türünü eşzamanlı olarak saptayabilme kapasitesi, tanısal etkinliğini artıran önemli bir avantaj sağlamaktadır (Muriqi, 2016).

2.7.1. Cins ve Tür Düzeyinde Tanımlama

Enterokokların fenotipik özelliklerinin değerlendirilmesinde farklı kültür ortamları kullanılmaktadır. Arginin deaminaz aktivitesinin belirlenmesinde Moeller'in dekarboksilaz besiyeri, hareketlilik testlerinde yarı katı agar ve genel bakteriyel üremenin gözlemlenmesinde kanlı agar tercih edilmektedir (Akdemir, 2010). Enterokok şüphesi taşıyan izolatlar, ön değerlendirme aşamasında koloni morfolojisi ve Gram boyama mikroskopisi gibi temel bakteriyolojik yöntemlerle incelenmektedir. Bu ön bulgulara dayanarak, kesin tür tayini için ileri düzey identifikasyon testlerine başvurulmaktadır (Muriqi, 2016).

yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Muriqi, 2016). Safra-eskulin ortamında eskulinin hidrolizi sonucunda glikoz ve eskületin açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan eskületin, ortamda bulunan ferrik iyonlarla etkileşime girmesi sonucunda zamanla siyah renkli bir kompleks oluşmaktadır (Sayiner, 2008).

➤ **L-pirolidonil-β-naftilamid testi:**

L-pirolidonil-β-naftilamid (PYR) testi, özellikle enterokoklar ile A grubu beta-hemolitik streptokokların tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan önemli bir biyokimyasal testtir. Bu testte kullanılan substrat olan L-pirolidonil-β- naftilamid, bakteriyel pyrrolidonil arilamidaz enzimi tarafından özgül bir şekilde hidrolize edilmektedir. Hidroliz sonucunda serbest β-naftilamid açığa çıkmakta ve ardından uygulanan reaktifle birlikte ortamda kırmızı renk oluşmaktadır. Bu renk değişimi, testin pozitif olduğunu göstermektedir (Sayiner, 2008).

PYR maddesinin potansiyel karsinojenik özellikler taşıdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle günümüzde, laboratuvar ortamlarında substratın manuel olarak hazırlanması yerine, ticari olarak temin edilebilen hazır kitlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu kitler genellikle, substrat emdirilmiş PYR diskleri içermekte olup, bazı ticari formlarda ise substrat sıvı halde sunulmaktadır (Muriqi, 2016).

➤ **% 6,5' luk NaCl üreme:**

Enterokoklar, yüksek tuz konsantrasyonlarına karşı tolerans gösterebilen mikroorganizmalardır ve % 6,5 NaCl içeren ortamlarda üreyebilmeleri, bu ayırt edici özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla, BHI agarına % 6,5 oranında sodyum klorür eklenerek hazırlanan besiyerine şüpheli koloni inoküle edilmekte ve 37 °C'de 24–48 saat süreyle inkübe edilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde üremenin gözlenmesi, testin pozitif olduğunu ve izolatın enterokok ile uyumlu özellik gösterdiğini ortaya koymaktadır (Koç, 2009).

2.7.2. Moleküler Yöntemler

Enterokok türlerinin genetik ve moleküler yöntemlerle tanımlanmasında; DNA hibridizasyonu, ribotipleme, Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ve PZR gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında, en etkili ve güvenilir olanın PFGE tekniği olduğu bildirilmektedir (Akdemir, 2010). Nükleik asit hedefli moleküler

yöntemler, izolatların karakterizasyonunu ortaya koyarak klonal düzeyde ayırım yapılmasına olanak sağlamaktadır. Son dönemlerde geliştirilen bazı moleküler tiplendirme yöntemleri ise aşağıda sıralanmaktadır (Muriqi 2016).

- PFGE
- Çoklu Lokus Dizi Tip Analizi (MLST)
- Çoklu Lokus Değişken Sayılı Tandem Tekrar Analizi (MLVA)
- Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS)
- Tüm Genom Dizilimi (WGS)
- Oxford Nanopore Teknolojisi (ONT)

2.8. Enterokoklarda Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal ajanların keşfi ve enfeksiyon hastalıklarının mikrobiyolojik temellerinin anlaşılması, bu hastalıkların etkin tedavisini mümkün kılarak enfeksiyon kontrolünde önemli bir gelişme sağlamıştır. Ancak bazı mikroorganizmaların belirli antibiyotiklere doğal olarak duyarsız olduğu kısa sürede anlaşılmıştır (Miller ve ark., 2014). Bu bakteriler, yalnızca intrinsik dirençle sınırlı kalmayıp genetik yapılarındaki yüksek plastisite sayesinde kazanılmış direnç genlerini de edinebilmektedir (Khan ve ark., 2022). Dünya Sağlık Örgütü, antibiyotik direncini bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirme yeteneği olarak tanımlar ve bu durum farklı mekanizmalarla gelişebilir (Lukasova ve Sustackova, 2003).

Enterokoklar birçok antibiyotik sınıfına karşı doğal dirençlidir ve bunun yanında mutasyonlar ya da direnç genlerinin kazanılmasıyla edinilmiş direnç geliştirebilir. Bu genler, plazmitler ve transpozonlar aracılığıyla yatay gen transferiyle yayılabilir (Kalfopoulou ve Huebner, 2020). Sefalosporinler ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi ajanlara intrinsik direnç gösteren enterokoklar, β -laktamlar ve aminoglikozitlere karşı ise düşük düzeyde dirençlidir (Rosvoll, 2012; Marques ve ark., 2023). Bazı suşlarda gelişen yüksek düzeyli direnç, enterokokların nozokomiyal enfeksiyonlarda daha etkili patojenler haline gelmesine neden olmaktadır (Braiek ve Smaoui, 2019).

Antibiyotik çağının başlangıcı, salvarsan, sülfonamidler ve penisilin gibi ajanların yaygın kullanımıyla oluşmuştur. Bu süreçte bazı bakteriler doğal dirençle

avantaj sağlarken, bazıları hızla direnç geliştirmiştir (Gaca ve Lemos, 2023). Enterokoklarda direnç; mutasyonlar veya yeni genetik materyalin alınmasıyla oluşur (Sood ve ark., 2008). Ayrıca bu bakteriler, direnç genlerini diğer türlere de aktarabilir. Antibiyotiklerin etkili olabilmesi için uygun hedef yapının bulunması, ilacın hücre içine alınabilmesi ve ilacı inaktive eden enzimlerin olmaması gereklidir (Lukasova ve Sustackova, 2003). Enterokoklar; penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, linkozamidler, streptograminler ve düşük düzey aminoglikozitlere karşı intrinsek direnç göstermektedir. Bu doğal direnç, başta hücre duvarı yapısındaki özellikler ve antibiyotiklerin hedef bölgelere erişimini sınırlayan mekanizmalar olmak üzere çeşitli yapısal faktörlerle ilişkilidir (Hollenbeck ve Rice, 2012). Bununla birlikte enterokoklar, mobil genetik elemanlar aracılığıyla zaman içerisinde kazanılmış direnç mekanizmaları da geliştirebilmektedir. Klinik açıdan büyük önem taşıyan bu kazanılmış dirençler arasında; yüksek düzey aminoglikozit direnci (HLAR), glikopeptid (özellikle vankomisin) direnci (*vanA* ve *vanB* genleri), beta-laktamlara karşı artmış direnç (*pbp5* genindeki mutasyonlarla ilişkili), ayrıca linezolid, makrolid ve tetrasiklin grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençler bulunmaktadır (Arias ve Murray, 2012). Ayrıca, *E. faecium* suşlarında ampisilin, HLAR, makrolid, tetrasiklin, kloramfenikol, kinolon, glikopeptid (özellikle vankomisine dirençli enterokoklar, VRE) ve linezolid gibi birçok ajana karşı edinilmiş dirençler gözlenmektedir (Cetinkaya, 2000; Leclercq ve Courvalin, 2008; Werner ve Klare, 2017). Enterokok tedavisinde genellikle β -laktam veya glikopeptid antibiyotikler, aminoglikozitlerle kombine edilerek bakterisidal etki sağlanmaya çalışılır (Rosvoll, 2012). Ancak, vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptidlere karşı gelişen direnç, özellikle immünsüpresif hastalardaki nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde ciddi bir sorundur. Bu ilaçlar, çoğu zaman son seçenek olarak kullanılmaktadır (Klein, 2003).

2.8.1. Aminoglikozid Direnci

Enterokok türlerinde aminoglikozitlere karşı yüksek düzeyde direnç yaygın olarak gözlenmekte olup, bu durum çoğunlukla aminoglikozit modifiye edici enzimler (AME)'in sentezi ile ilişkilidir (Tendolkar ve ark., 2003). Aminoglikozitler, bakteriyel 30S ribozomal alt biriminin 16S rRNA'sındaki A bölgesine bağlanarak kodonların hatalı okunmasına neden olmakta ve peptidil-tRNA translokasyonunu engelleyerek

protein sentezini inhibe etmektedir (Gerald ve ark., 2022). Bu mekanizma, translasyon hatalarını artırarak toksik protein birikimine ve sonuç olarak bakterisidal etkiye yol açmaktadır. Enterokoklar, aminoglikozitlerin klinik dozlarına karşı intrinsik direnç sergilemektedir (Gaca ve Lemos, 2019; Vu ve Carvalho, 2011). Bu direnç orta veya yüksek düzeyde gelişebilmekte ve tedavi stratejilerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Baysal, 2019). Yüksek düzey direnç saptanmasında Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI), disk difüzyon ve agar dilüsyon testlerinde Mueller Hinton Agar (MHA) kullanımını önerirken; mikrodilüsyon testlerinde daha güvenilir sonuçlar sağladığı için BHI besiyeri tercih edilir (Khan ve ark., 2022). Klinik olarak en yaygın direnç mekanizması, AME'nin aracılık ettiği enzimatik modifikasyondur. Bu enzimler fosfotransferaz, asetiltransferaz ve nükleotidiltransferaz olmak üzere üç grupta sınıflandırılır (Baysal, 2019).

2.8.2. Glikopeptid Direnci

Glikopeptit antibiyotikler (vankomisin ve teikoplanin), peptidoglikan sentezini inhibe ederek bakteriyel hücre duvarı oluşumunu engellemektedir. Bu etkilerini, peptidoglikan öncülerinin D-Ala-D-Ala uçlarına bağlanarak çapraz bağlanma süreçlerini durdurmak suretiyle gösterirler (Miller ve ark., 2019). Lipoglikopeptitler ise sahip oldukları lipofilik yan zincirler aracılığıyla hücre zarına daha güçlü şekilde bağlanmakta ve uzamış yarı ömürleri sayesinde daha belirgin bir antibakteriyel etki sağlamaktadırlar (Driscoll ve Crank, 2015).

Vankomisin, özellikle ampisiline dirençli enterokok enfeksiyonlarında ve beta-laktam alerjisi olan hastalarda uzun yıllar birinci seçenek olarak kullanılmış, ancak bu yaygın kullanım VRE suşlarının ortaya çıkmasına ve nozokomiyal yayılımına yol açmıştır (Khan ve ark., 2022). Vankomisin direnci, çoğunlukla transpozonlar ve plazmitler aracılığıyla taşınabilen çeşitli *van* genotipleri sayesinde gelişmektedir. Bu genotipler arasında en sık karşılaşılanlar *vanA*, *vanB* ve *vanC* olup; daha nadir olarak *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* genotipleri de tanımlanmıştır (Miller ve ark., 2014; Gerald ve ark., 2022). Ayrıca, *vanZ* geninin teikoplanin direncinden sorumlu bir protein kodladığı öne sürülmekte ve bu genin bağımsız ekspresyonunun teikoplanin direncine yol açabileceği bildirilmektedir. Bu genetik çeşitlilik, enterokokların vankomisine karşı farklı direnç stratejileri geliştirebildiğini ve tedavi planlamasında bu heterojenitenin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (Vu ve

Carvalho, 2011; Mahalleh ve Göncüoğlu, 2017). Öte yandan, *vanB* genotipine sahip VRE suşlarında teikoplanin'in etkinliği belirsizliğini korumaktadır. Bu tedavi sırasında dirençli *vanB* mutantlarının ortaya çıkabileceği ve bu durumun tedavi başarısını olumsuz etkileyebileceği çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Mischnik ve ark., 2019).

2.8.3. B -Laktam Direnci

Ampisilin ve penisilin, enterokoklara karşı en etkili β -laktam antibiyotikler arasında yer almakta olup, bakteriyel canlılık için kritik olan peptidoglikan sentezini inhibe ederek etki gösterirler (Rosvoll, 2012; Geraldes ve ark., 2022). Bu antibiyotiklerin temel hedefi, hücre duvarı sentezinde görev alan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak peptidoglikan yapısının bütünlüğünü bozmaktır (Mutuku, 2012). Peptidoglikan sentezinin bozulması, bakterilerin yaşamsal fonksiyonlarını doğrudan etkileyerek antimikrobiyal etkinin temelini oluşturmaktadır (Miller ve ark., 2014). Rifampisin ise RNA sentezini inhibe eden bir rifamisin türevidir olup, DNA'ya bağımlı RNA polimerazın β -alt birimine bağlanarak mRNA transkripsiyonunu durdurmaktadır (Miller ve ark., 2014). Bununla birlikte, enterokokların PBP yapılarındaki yapısal farklılıklar nedeniyle β -laktamlara karşı intrinsik direnç gelişebilir. Özellikle VRE suşlarında β -laktamların bu hedef proteinlere bağlanma afinitesi belirgin şekilde azalabilmektedir (Driscoll ve Crank, 2015). Enterokoklarda β -laktam duyarlılığının değerlendirilmesinde, disk difüzyon ve E-test gibi manuel testler yüksek güvenilirlikleri nedeniyle yaygın olarak önerilmektedir (Khan ve ark., 2022).

2.8.4. Oksazolidinon Direnci

Enterokok kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde, oksazolidinon grubu antibiyotiklerden linezolid etkili bir seçenek olarak kullanılmaktadır. Ancak tedavi sürecinde, *E. faecalis* ve *E. faecium* gibi klinik izolatlarda linezolid direnci gelişebilmektedir (Mahalleh ve Göncüoğlu, 2017). Linezolid, Gram pozitif bakterilere karşı geniş spektrumlu, bakteriyostatik bir ajan olup, 23S rRNA'ya bağlanarak aminoasil-tRNA'nın ribozomun A bölgesine yerleşmesini engellemektedir. Bu durum, peptid bağlarının oluşumunu ve polipeptit zincirinin uzamasını engelleyerek protein sentezini durdurmaktadır. Linezolid direncinin en sık görülen mekanizmasını,

ribozomdaki ilaç bağlanma bölgesini kodlayan 23S rRNA genlerinde meydana gelen mutasyonlar oluşturmaktadır (Miller ve ark., 2014; Prieto ve ark., 2016).

2.8.5. Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklinler, 30S ribozomal alt birime bağlanarak aminoasil-tRNA'nın A bölgesine girişini engellemekte ve böylece protein sentezini inhibe etmektedir. Bu etkileşim, 16S rRNA'nın belirli halkaları ve ribozomal protein S7 ile gerçekleşmektedir. Etkilerinin geri dönüşümlü nitelikte olması nedeniyle tetrasiklinler bakteriyostatik etki göstermektedir (Pearson ve ark., 2025). Bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç başlıca iki temel mekanizmaya dayanmaktadır. Bunlar, antibiyotığın hücre dışına taşınmasını sağlayan efluks pompaları ile ribozomal hedefin korunmasına yönelik protein temelli savunma sistemleridir (Miller ve ark., 2014). Tetrasikline direnç ilk olarak *E. faecalis*'te gözlemlenmiş, daha sonra *E. faecium* suşlarında da bildirilmiştir (Prieto ve ark., 2016). Dirençli enterokoklarda *tetM*, *tetQ* ve *tetN* gibi genlerin varlığı, bu ilaç grubunun etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu genlerin yayılımı, tedavi başarısını olumsuz etkileyerek önemli klinik sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle, tetrasiklin direnciyle ilişkili genlerin yayılımını sınırlamak ve etkili tedavi stratejileri geliştirmek, enfeksiyon kontrolü açısından kritik öneme sahiptir (Mahalleh ve Göncüoğlu, 2017).

2.8.6. Lipopeptid Direnci

Lipopeptid antibiyotikler, farklı moleküler yapıları ve çeşitli etki mekanizmaları sayesinde geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar arasında yer almaktadır. Bu grubun en güncel üyelerinden biri olan daptomisin, özellikle Gram pozitif bakterilere bağlı enfeksiyonların tedavisinde etkinliğiyle öne çıkmaktadır (Khan ve ark., 2022). Benzer şekilde, telavansin ventilatörle ilişkili pnömonisi olan yetişkin hastalarda onay almış, ancak komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında henüz kullanım onayı bulunmamaktadır (Corey ve ark., 2014). Lipopeptitlerin VRE suşlarına karşı etkinliği genotipe bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Telavansin ve dalbavansin, yalnızca *vanB* genotipine sahip suşlara karşı etkili bulunurken, *vanA* genotipli enterokoklara karşı sınırlı aktivite göstermektedir (Cairns ve ark. 2023). Buna karşın oritavansin, *vanC* fenotipleri de

dahil olmak üzere tüm VRE türlerine karşı in vitro koşullarda yaklaşık 16 kat daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilemektedir (Carvalhaes ve ark., 2022).

Daptomisin, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından *Staphylococcus aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için onaylanmış, siklik yapıda bir lipopeptittir. Çok ilaca dirençli enterokok enfeksiyonlarında ise saf formu endikasyon dışı kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2022). Standart dozlarda sınırlı etki göstermesine rağmen, yüksek dozlarda (özellikle enterokokal endokardit tedavisinde) klinik başarı sağlandığı bildirilmiştir (Mischnik ve ark., 2019).

Daptomisin'in etki mekanizması, sitoplazmik membranda kalsiyum bağımlı depolarizasyona neden olarak potasyum iyonlarının hücre dışına çıkmasını sağlamakta ve bu durum hücre ölümünü tetiklemektedir (Dubin ve Pamer, 2017). Daptomisin direnci ile ilişkili başlıca iki hücre zarı proteini, gdpD (Gliserofosforil diester fosfodiesteraz) ve LiaF (lipit II döngüsü antibiyotik direnç proteini) olarak tanımlanmıştır (Kalfopoulou ve Huebner, 2020).

2.9.Vankomisin Dirençli Enterokoklar

VRE, hızla yayılan ve küresel ölçekte ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelen patojenlerdir (Ramos ve ark., 2020). Enfeksiyonlar öncesinde genellikle gastrointestinal kolonizasyonla başlayan VRE varlığı, daha az sıklıkla cilt, genitoüriner sistem ve oral boşlukta da tespit edilebilmektedir (Driscoll ve Crank, 2015). CLSI'ye göre enterokoklarda vankomisin direnci, MİK ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ olarak tanımlanmaktadır (Reyes ve ark., 2016).

Vankomisin direnci enterokoklarda, *van* genleri aracılığıyla gelişmekte olup, bugüne kadar *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* olmak üzere toplam dokuz farklı gen tanımlanmıştır. Bu genler arasında *vanA* ve *vanB*, hem yaygınlıkları hem de klinik önemleri açısından öne çıkmakta; en sık vankomisine dirençli *E. faecium* (VRE_{fm}) ve vankomisine dirençli *E. faecalis* (VRE_{fs}) izolatlarında saptanmaktadır (Zhou ve ark., 2020). Vankomisin, hücre duvarı öncüllerinin D-alanil-D-alanin uçlarına bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe etmek suretiyle etki göstermektedir (Kazıwe, 2019). Öte yandan, vankomisin değişkenli enterokoklar (VVE), *vanA* genotipini taşımalarına rağmen başlangıçta duyarlı olup, glikopeptit maruziyeti sonrasında direnç geliştirebilmektedir. Bu durum bazı ülkelerde salgınlara neden olabilmektedir (Marques ve ark., 2023). Enterokokal enfeksiyonların çoğu,

önceki kolonizasyon sürecine bağlı olarak gelişmekte ve pek çok olguda enterokoklara özgü antibiyotik tedavisi uygulanmaksızın klinik iyileşme sağlanabilmektedir (Driscoll ve Crank, 2015).

VRE'nin anlaşılması, enfeksiyonların önlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Antibiyotik kullanımı, invaziv girişimler, yoğun bakım yatışı, uzun hastane süresi ve kontamine yüzeylerle temas, başlıca risk faktörleri arasında yer almaktadır (Sood ve ark., 2008; Reyes ve ark., 2016). Enterokoklar, çevresel koşullara karşı dirençli yapıları nedeniyle persistan mikroorganizmalar olarak kabul edilmekte ve bu özellikleri hastane ortamlarında eradikasyonlarını zorlaştırmaktadır (Ramos ve ark., 2020).

2.10. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi

Komplike olmayan enterokok enfeksiyonları, genellikle ampisilin, penisilin veya vankomisin gibi tek ajanlı tedavilere iyi yanıt verirken, VRE varlığı tedavi sürecini karmaşıklaştırmakta ve özel duyarlılık testlerini gerekli kılmaktadır (Sood ve ark., 2008; Arias ve Murray, 2012). Beta laktamaz üreten suşlarda, penisilin ve ampisiline direnç, konvansiyonel testlerle güvenilir biçimde saptanamayabilir (Sood ve ark., 2008). Çoğu enterokoka karşı Penisilin G, ampisilin, vankomisin ve teikoplanin bakteriyostatik etki gösterirken, bakterisidal etki için bu ajanlar genellikle streptomisin veya gentamisin gibi aminoglikozidlerle kombine edilir (Kandemir, 2012; Rice, 2012). Ancak aminoglikozitlere karşı gelişen yüksek düzeyde direnç, bu kombinasyonların etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır (Arias ve Murray, 2012; Baysal, 2019). Diğer yandan, enterokoklara karşı aşı geliştirme çalışmaları sürmektedir. Bu çalışmalarda hücre yüzeyi proteinleri, adezinler ve toksinler gibi virülans faktörleri, potansiyel aşı hedefleri olarak değerlendirilmektedir (Kalfopoulou ve Huebner, 2020; Hancock ve Perego, 2020). Ancak enterokokların genetik çeşitliliği ve direnç mekanizmaları, etkili bir aşının geliştirilmesini güçleştirmektedir (Arias ve Murray, 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırmanın Türü ve Örnek Seçimi

Bu çalışmada, Kafkas Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin çeşitli poliklinik ve servislerinden Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen enterokok izolatları değerlendirildi. Çalışmaya, enterokok olarak tanımlanan toplam 99 klinik izolat dahil edildi. Bu izolatlar; 70 idrar örneği, 12 kan örneği, 7 trakea aspiratı, 4 abse sürüntüsü, 3 vajen sürüntüsü ve 3 yara sürüntüsünden elde edildi. Tüm örnekler, çalışmaya alınincaya kadar Broth besiyerine inoküle edilerek -20 °C'de uygun koşullarda muhafaza edildi.

Çalışma, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 24.05.2023 tarihli ve 80576354-050-99/315 sayılı kararı ile etik kurul onayı alınarak yürütüldü. Ayrıca, bu tez çalışması Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 2023-TS-94 numaralı proje kapsamında desteklendi.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

- Kanlı agar (Merck Millipore 110886.0500)
- Mueller-Hinton Agar (Merck Millipore 103872.0500)
- PYR testi (Chembio CB4510)
- Bactident Katalaz (Merck Millipore 111351.0001)
- Gram boyama seti (Merck Millipore 111885.0001)
- İmipenem 10 µg (Conda Lab 7052)
- Teikoplanin 30 µg (Conda Lab 7088)
- Siprofloksasin 5 µg (Conda Lab 7034)
- Vankomisin 30 µg (Conda Lab 7145)
- Linezolid 30 µg (Conda Lab 7125)
- Ampisilin 10 µg (Conda Lab 7004)
- Nitrofurantoin 300 µg (Conda Lab 7066)
- Levofloksasin 5 µg (Conda Lab 7056)
- Fosfomisin 50 µg (Conda Lab 7114)
- Tris-base (BioShop Canada TRS001.1)
- Borik asit (BioShop Canada BOR001.1)

- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) Disodyum Dihidrat (BioShop Canada EDT001.1)
- Süzkroz (BioShop Canada SUC507.1)
- Brom fenol mavisi (BioShop Canada BRO222.25)
- Etidyum Bromid (BioShop Canada ETB333.5)
- Agaroz (BioShop Canada AGA001.500)
- Platinum™ Taq DNA Polimerazı (Thermo Fisher 15966025)
- 10X Taq Buffer (Thermo Fisher B38)
- MgCl₂ (Thermo Fisher R0971)
- dNTP Seti (Thermo Fisher R0182)
- Nuclease Free Su (Thermo Fisher 10977015)
- DNA Marker (Thermo Fisher SM0244)
- Primerler (Sentebiolab 100nmol HPLC) (Tablo 5 ve 9'da gösterilmiştir)

3.2.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- 0.2ml PZR tüpleri (Labselect PT-02-C)
- 1,5 mL Mikro Santrifüj tüpü (Labselect MCT-001- 150)
- 1000µ pipet uçları (Labselect FT-1000-R-S)
- 10µl pipet uçları (Labselect FT-10-R-S)200µ pipet uçları (Labselect FT-200-R-S)
- 2 mL Polipropilen kutu (Biosharp BS-20- TB100S)
- Biyogüvenlik kabini (Nüve MN 120)
- Buzdolabı (+4) (Arçelik 570505 EB)
- Derin dondurucu (-20) (Arçelik 1031-T)
- Distile su cihazı (Lauda PD4R)
- Elektroforez güç kaynağı (Clever Scientific nanoPAC-300P)
- Elektroforez tankı (Clever Scientific 230206040)
- Etüv (Mettler IN110)
- Hassas terazi (Ohaus- PA214C)
- Jel görüntüleme cihazı (GEN-BOX imagER Cfx | ER Biotech Ltd.)
- Mikrodalga fırın (Vestel MD 20 MB)
- Mikropipet seti (Eppendorf 3123000900)

- NanoDrop (NANODROP 2000)
- Nitril Eldiven (Mumu)
- Otoklav (Zealway-GR60DA)
- Petri 90 mm (Corning GOSB93-102- K)
- Santrifüj cihazı (Four E'S Scientific CF0201002)
- Tüp kutusu (İsolab 080.01.002)
- Vorteks cihazı (FİNEVORTEX-FİNEPCR)

3.2.3. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

➤ 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8

Tris Base (108 gr), Borik asit (55 gr) ve EDTA (8,3 gr) bir miktar distile su içerisinde çözdürüldü ve çözeltinin pH'sı 8,8'e ayarlandı. Ardından, son hacim 1 litreye tamamlanacak şekilde distile su ilave edildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

➤ Elektroforez yükleme tamponu

1X TBE tamponu, 100 mL 10X TBE stok çözeltisi ile 900 mL distile suyun karıştırılmasıyla hazırlandı. Elde edilen tampon çözelti, elektroforez uygulamalarında yürütme tamponu olarak kullanıldı. Tamponun etkinliğini sürdürabilmesi amacıyla haftalık aralıklarla taze şekilde hazırlandı ve yenilendi.

➤ Yükleme Tamponu (20 mL için)

Yükleme tamponunun hazırlanmasında 4 gram sükröz ve 0,05 gram brom fenol mavisi kullanıldı. Tartılan kimyasallar, 20 mL 1X TBE tamponu içerisinde çözüldürülerek homojen bir çözelti elde edildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

➤ %1,5'lik Agaroz Jel

1,5 gram agaroz, 100 mL 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında tamamen çözüldürülerek eritildi. Elde edilen çözeltiye, 10 µL etidyum bromür (EtBr) eklendi ve homojen bir şekilde karıştırıldı.

3.2.4. Kullanılan Besiyerlerin Hazırlanması

➤ Kanlı Agar Besiyeri

Ticari olarak temin edilen toz formdaki kanlı agar besiyeri, 42,0 g/L konsantrasyonunda hazırlanmak üzere distile su ile karıştırıldı. Elde edilen karışım, 121 °C'de 15 dakika süreyle ve 1 atmosfer basınç altında otoklavlanarak sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyonun ardından agar karışımı yaklaşık 50–55 °C'ye kadar soğutuldu. Bu aşamada, steril koşullar altında her 100 mL agar karışımına 5–10 mL taze insan kanı ilave edildi. Tam homojenizasyon sağlandıktan sonra, hazırlanan besiyeri steril petri kaplarına döküldü ve oda sıcaklığında 30–60 dakika bekletilerek katılaşması sağlandı. Katılaştıran besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4 °C'de steril buzdolabında muhafaza edildi.

➤ Mueller-Hinton besiyeri

Ticari olarak temin edilen toz formdaki Mueller-Hinton agar besiyeri, 38,0 g/L konsantrasyonunda hazırlanmak üzere distile su ile karıştırıldı. Elde edilen karışım, 121 °C'de 15 dakika süreyle ve 1 atmosfer basınç altında otoklavlanarak sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyonun ardından, agar karışımı yaklaşık 50–55 °C'ye kadar soğutuldu. Soğutulan besiyeri, steril koşullarda petri kaplarına döküldü ve oda sıcaklığında yaklaşık 30-60 dakika bekletilerek katılaşması sağlandı. Katılaştıran besiyerleri, kullanılıncaya kadar +4 °C'de steril buzdolabında muhafaza edildi. Kullanım öncesinde, yüzeydeki nem dengesinin korunması amacıyla oda sıcaklığında bekletilerek dengeleme işlemi uygulandı.

3.2.5. Kullanılan Bilgisayar ve Yazılım Programları

- NCBI Nükleotid veritabanı;
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch
- NanoDrop 2000 versiyon 1.6
- İmager Eyes Capture Yazılımı
- IBM SPSS Statistics 20

3.3.Yöntemler

3.3.1. Klinik Örneklerin Toplanması ve Enterokok İzolatlarının İdentifikasyonu

Bu çalışmada, Kasım 2023-Nisan 2024 tarihleri arasında Kafkas Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin çeşitli servis ve polikliniklerinden Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen toplam 99 enterokok izolatı değerlendirildi. Hastaların başvurduğu klinik birimlere göre örnek türü, yaş ve cinsiyet bilgileri kayıt altına alındı. Klinik örnekler uygun besiyerlerine ekilerek 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında üreme saptanan kültürlerde identifikasyon işlemleri; koloni morfolojisi, hemolitik aktivite, katalaz reaksiyonu ve PYR testi esas alınarak gerçekleştirildi.

β -hemolitik veya γ -hemolitik aktivite sergileyen, koloni rengi süt beyazı ya da sarımtırak olan, katalaz negatif, PYR pozitif ve mikroskopik incelemede Gram pozitif kok morfolojisinde gözlemlenen izolatlar enterokok olarak kabul edildi. Tanımlanan izolatlar broth besiyerine alınarak -20 °C'de saklandı.

3.3.2. İzolatların Canlandırılması

Saklanan izolatlar, canlandırılmak üzere steril öze yardımıyla broth besiyerine inoküle edilerek 37 °C'de 18–24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyonun ardından elde edilen kültürlerden, tek koloni izolasyonu amacıyla %5 koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıldı. İkinci inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra besiyerinde herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığı kontrol edildi ve üreyen kolonilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri yeniden değerlendirildi.

3.3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Bu çalışmada antimikrobiyal duyarlılık testleri, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirildi.

- Steril öze ya da pamuklu eküvyon yardımıyla koloniden salin süspansiyonu hazırlandı.
- Bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerinden, 0.5 McFarland standardına eşdeğer bulanıklıkta süspansiyon elde edildi.

- Hazırlanan süspansiyon, agar yüzeyine homojen dağılım sağlamak amacıyla üç farklı yönde sürülerek yayıldı.
- İnkübasyondan hemen önce antibiyotik diskleri, agar yüzeyine aralarında en az 25 mm mesafe olacak şekilde yerleştirildi.
- Test edilen antibiyotikler Tablo 4. de verilmiştir:

Tablo 4. EUCAST Kriterlerine Göre Enterokok İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sınır Değerleri.

ÖRNEK TÜRÜ	İDRAR	GRUP	ANTİBİYOTİKLER	R	S
		A	Ampisillin	<8	≥10
A	Nitrofurantoin	<15	≥15		
A	Fosfomisin	<16	≥16		
A	Teiklopanin	<16	≥16		
B	Siprofloksasin	<15	≥15		
B	Levofloksasin	<15	≥15		
B	İmipenem	<21	≥50		
C	Vankomisin	<12	≥12		
C	Linezolid	<20	≥20		
İDRAR DIŞI	A	Ampisillin	<8	≥10	
	A	Vankomisin	<12	≥12	
	A	Linezolid	<19	≥19	
	A	Teikoplanin	<16	≥16	
	B	Gentamisin	<15	≥15	

R: Dirençli, S: Duyarlı

3.3.4. DNA Örneklerinin Elde Edilmesi

- Taze kültür kolonileri, %5 koyun kanlı agar besiyerinden uygun şekilde toplandı.
- Seçilen koloniler, 100 µL steril distile su ile karıştırılarak homojen bir süspansiyon elde edildi. Bu adım ile nükleik asit izolasyonu için gerekli ön hazırlık sağladı.
- Elde edilen süspansiyon, 100 °C’de 10 dakika boyunca kaynatılarak ısıl işleme tabi tutuldu. Bu işlemle, enzimatik bozulmaların önlenmesi ve DNA stabilitesinin artırılması hedeflendi.
- Isıl işlem sonrasında süspansiyon, 5000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu sayede hücresel kalıntılar ve diğer yabancı maddeler uzaklaştırıldı.

- Santrifüjün ardından oluşan süpernatant dikkatlice alındı. Elde edilen DNA örnekleri, ileri analizlerde kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

3.3.5. DNA’ların Nanodrop Spektrofotometre ile Ölçümü

Nanodrop cihazı ölçümler öncesinde üretici firmanın talimatlarına uygun şekilde, kuvars yüzeye 1–2 µL distile su uygulanarak kalibre edildi. Cihazın ölçüm platformu, her kullanım öncesinde steril bir bez ile temizlenerek potansiyel kontaminasyonların önlenmesi sağlandı. DNA örnekleri platforma yerleştirildikten sonra, 260/280 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen absorbans değerleri temel alınarak DNA konsantrasyonları ng/µL cinsinden hesaplandı. Konsantrasyonu 10 ng/µL ve üzeri olan örnekler yeterli kabul edilerek çalışmaya dahil edildi.

3.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu çalışmada, kültürde *Enterococcus spp.* olarak tanımlanan izolatların tür düzeyinde doğrulanabilmesi ve aynı zamanda potansiyel patojenite özelliklerinin ortaya konabilmesi amacıyla, hem tür spesifik gen bölgeleri hem de virülans faktör genlerini hedefleyen primer çiftleri kullanılarak PZR yöntemi uygulandı. Uygulama sürecinde;

- DNA ekstraksiyonu, master mix hazırlanması ve örnek DNA’nın reaksiyona eklenmesi işlemleri birbirinden bağımsız üç ayrı laboratuvar alanında gerçekleştirildi.
- Isı iletimi kaynaklı farklılıkları minimize etmek için ince cidarlı, DNase ve RNase’den arındırılmış steril 0.2 µl PZR tüpleri kullanıldı. Reaksiyon karışımları küçük hacimlere paylaştırılarak tüplere dağıtıldı.
- Çalışma boyunca aerosol bariyerli (filtreli) pipet uçları ile kullanıldı. Pudrasız eldivenler tercih edilerek kontaminasyon riski azaltıldı.
- Çalışma alanları düzenli aralıklarla UV ışık altında tutuldu. Ek olarak, sodyum hipoklorit solüsyonu ile yüzey dezenfeksiyonu sağlandı.

3.3.6.1. Enterokok Türlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kültürde *Enterococcus spp.* olarak tanımlanan izolatların moleküler düzeyde doğrulanması ve tür tayini olarak iki aşamalı bir PZR protokolü ile

gerçekleştirildi. İlk aşamada, genus düzeyinde doğrulama için enterokok cinsine özgü 16S rRNA hedefli primer çiftleri kullanıldı. İkinci aşamada, genus pozitifliği gösteren izolatlarda *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium* ve *E. gallinarum* türlerine özgü primer çiftleri ile tür tayini in house mütipleks PZR tekniği uygulandı. PZR amplifikasyonlarında kullanılan primer dizi çiftleri Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Enterokok türlerinin belirlenmesi için PZR amplifikasyonunda kullanılan primer dizi çiftleri.

Tür	Hedef bölge uzunluğu (bç)	Annealing derecesi (°C)	Primer Dizileri (5’-3’)
<i>Enterococcus spp.</i> *	112	62	F: TACTGACAAACCATTTCATGAT R: AACTTCGTCACCAACGCGAAC
<i>E. durans</i> **	295	50	F: CCTACTGATATTAAGACAGCG R: TAATCCTAAGATAGGTGTTTG
<i>E. faecalis</i> ***	360		F: ACTTATGTGACTAACTTAACC R: TAATGGTGAATCTTGTTTGG
<i>E. faecium</i> ***	215		F:GAAAAACAATAGAAGAATTAT R: TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA
<i>E. gallinarum</i> *	173		F: TTA CT TGCTGATTTTGATTTCG R: TGAATTCTTCTTTGAAATCAG

*: Jahansepas, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Heidarzadeh, S., Mardaneh, J., Mohammadzadeh, A., & Pouresmaeil, O. (2022). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus spp.* isolated from traditional cheese types. *Ethiopian journal of health sciences*, 32(4), 799-808.
 **: Mohanty, S., & Behera, B. (2022). Antibigram Pattern and Virulence Trait Characterization of *Enterococcus* Species Clinical Isolates in Eastern India: A Recent Analysis. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 237-246.
 ***: Gök, Ş. M., Türk Dağı, H., Kara, F., Arslan, U., & Fındık, D. (2020). Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical samples.

PZR tekniğinde, *Enterococcus* genusunun doğrulanmasına yönelik yaklaşık 112 bç uzunluğundaki 16S rRNA gen bölgesi *Enterococcus spp.* primerleri ile; tür düzeyinde ayırım için ise *E. faecalis*’e özgü 360 bç, *E. durans* için 295 bç, *E. faecium* için 215 bç ve *E. gallinarum* için 173 bç uzunluğundaki gen bölgeleri, ilgili tür spesifik primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi. *Enterococcus* genus ve tür tayinine yönelik PZR reaksiyon karışımları Tablo 6 ve Tablo 7’de detaylı olarak yer almaktadır.

Tablo 6. *Enterococcus spp.*'ye özgü gen bölgesinin amplifikasyonu amacıyla her bir örnek için oluşturulan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktarlar (µl)
NFDS (Steril DNase ve RNase içermeyen su)	33,75
10X Taq Tampon	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM)	1
Forward primer (10 pmol/µL)	0,5
Reverse primer (10 pmol/µL)	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,25
DNA örneği	5
Toplam Hacim	5

Tablo 7. *E.faecalis*, *E.durans*, *E.faecium* ve *E.gallinarum* türlerine özgü gen bölgelerinin amplifikasyonu amacıyla her bir örnek için oluşturulan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktarlar (µl)
NFDS (Steril DNase ve RNase içermeyen su)	30,75
10X Taq Tampon	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM)	1
<i>E.durans</i> Forward (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.durans</i> Reverse (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.faecalis</i> Forward (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.faecalis</i> Reverse (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.faecium</i> Forward (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.faecium</i> Reverse (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.gallinarum</i> Forward (10 pmol/µL)	0,5
<i>E.gallinarum</i> Reverse (10 pmol/µL)	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,25
DNA örneği	5
Toplam Hacim	50

PZR reaksiyon karışımları vortekslenerek homojenize edildikten sonra, her örnek için numaralandırılmış steril 0,2 µl ince cidarlı PZR tüplerine 45 µl aktarıldı. Ardından, tüplere 5 µl DNA örneği eklenerek toplam hacim 50 µl'ye tamamlandı. Amplifikasyon işlemleri, *Enterococcus* genus ve tür spesifik hedef bölgeleri için optimize edilmiş sıcaklık ve döngü parametrelerine sahip in-house PZR protokollerine göre PZR cihazında yürütüldü. (Tablo 8 ve Tablo 9). İşlem sonrasında elde edilen amplifikasyon ürünleri, elektroforez uygulamasına kadar +4°C'de saklandı.

Tablo 8. *Enterococcus* türüne özgü gen bölgesinin amplifikasyonu için uygulanan sıcaklık ve süreleri*

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	1 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Primer bağlanması (Annealing)	62	1dk	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	30	
Son uzama (Post elongasyon)	72	10 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

*:Mohanty, S., & Behera, B. (2022). Antibigram Pattern and Virulence Trait Characterization of *Enterococcus* Species Clinical Isolates in Eastern India: A Recent Analysis. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 237-246.

*: Jahansepa, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Heidarzadeh, S., Mardaneh, J., Mohammadzadeh, A., & Pouresmaeil, O. (2022). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from traditional cheese types. *Ethiopian journal of health sciences*, 32(4), 799-808.

Tablo 9. *E.faecalis*, *E.durans*, *E.faecium* ve *E.gallinarum* türlerine özgü gen bölgelerinin amplifikasyonu için uygulanan sıcaklık ve süreleri*

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	4 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Primer bağlanması (Annealing)	50	1dk	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	7dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

*:Mohanty, S., & Behera, B. (2022). Antibigram Pattern and Virulence Trait Characterization of *Enterococcus* Species Clinical Isolates in Eastern India: A Recent Analysis. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 237-246.

3.3.6.2. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi

Enterokok türlerine ait izolatlarda başlıca virülans faktör genlerinin belirlenmesi, multipleks ve tekli PZR tekniği ile gerçekleştirildi. Bu amaçla *asal*, *ace*, *hyl*, *cylA*, *esp*, *gelE*, *ebp* ve *efaA* genlerini hedefleyen primer çiftleri kullanılarak amplifikasyon yapıldı. Virülans faktör genlerine yönelik PZR amplifikasyonlarında kullanılan primer dizi çiftleri ve hedef gen bölgeleri Tablo 10'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 10: *Enterococcus* türlerine özgü virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan primerler ve bant uzunlukları

Virülans Gen	Hedef bölge Uzunluğu (bç)	Annealing derecesi (°C)	Primer Dizileri (5'-3')
<i>asal</i> *	375	52	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA
<i>ace</i> *	616		F: GGAATGACCGAGAACGATGGC R: GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG
<i>hyl</i> *	276		F: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA
<i>cylA</i> *	688		F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT
<i>esp</i> **	510	58	F: AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG
<i>gelE</i> **	213		F: TATGACAATGCTTTTTGGGAT R: AGATGCACCCGAAATAATATA
<i>ebp</i> **	100		F: AAAAATGATTCGGCTCCAGAA R: TGCCAGATTCGCTCTCAAAG
<i>efaA</i> *	688	55	F: GCCAATTGGGACAGACCCTC R: CGCCTTCTGTTCCCTTTGGC

*: Jahansepa, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Heidarzadeh, S., Mardaneh, J., Mohammadzadeh, A., & Pouresmaeil, O. (2022). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from traditional cheese types. *Ethiopian journal of health sciences*, 32(4), 799-808.

** : Mohanty, S., & Behera, B. (2022). Antibigram Pattern and Virulence Trait Characterization of *Enterococcus* Species Clinical Isolates in Eastern India: A Recent Analysis. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 237-246.

PZR tekniğinde, *Enterococcus* izolatlarında *asal* genine ait 375 bç, *ace* genine ait 616 bç, *hyl* genine ait 276 bç, *cylA* genine ait 688 bç, *esp* genine ait 510 bç, *gelE*

genine ait 213 bç, *ebp* genine ait 100 bç ve *efaA* genine ait 688 bç uzunluğundaki bölgeler spesifik primer çiftleri kullanılarak amplifiye edildi.

Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için iki ayrı multipleks PZR ve bir adet tekli PZR protokolü uygulandı. İlk multipleks PZR mixinde *asa1*, *ace*, *hyl* ve *cylA* primerleri; ikinci multipleks PZR mixinde ise *esp*, *gelE* ve *ebp* primerleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi. Ayrıca *efaA* genine yönelik olarak ayrı bir tekli PZR uygulanarak amplifikasyon sağlandı. *Enterococcus* izolatlarının virülans faktör gen tayinine yönelik PZR reaksiyon içerikleri sırasıyla Tablo 11, Tablo 12 ve Tablo 13’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 11. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan multipleks PZR reaksiyon bileşenleri (PZR Mix 1)

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktarlar (µl)
NFDS (Steril DNase ve RNase içermeyen su)	30,75
10x TaqTamponu	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP (10 mM)	1
Primer 1 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 1 -R (10 pmol/µL)	0,5
Primer 2 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 2 -R (10 pmol/µL)	0,5
Primer 3 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 3 -R (10 pmol/µL)	0,5
Primer 4 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 4 -R (10 pmol/µL)	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,25
DNA örneği	5
Toplam Hacim	50
Primer1/2/3/4: <i>asa1/ace/hyl/cylA</i>	

Tablo 12. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan multipleks PZR reaksiyon bileşenleri (PZR Mix 2).

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktarlar (µl)
NFDS (Steril DNase ve RNase içermeyen su)	31,75
10x TaqTamponu	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP (10 mM)	1
Primer 1 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 1 -R (10 pmol/µL)	0,5
Primer 2 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 2 -R (10 pmol/µL)	0,5
Primer 3 -F (10 pmol/µL)	0,5
Primer 3 -R (10 pmol/µL)	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,25
DNA örneği	5
Toplam Hacim	50
Primer1/2/3: <i>esp, gelE, ebp</i>	

Tablo 13. Virülans faktör genlerinin belirlenmesi için kullanılan multipleks PZR reaksiyon bileşenleri (PZR Mix 3).

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktarlar (µl)
Distile Su	33,75
10X Taq Tampon	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM)	1
EfaA-Forward (10 pmol/µL)	0,5
EfaA-Reverse (10 pmol/µL)	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,25
DNA örneği	5
Toplam Hacim	50

Hazırlanan iki farklı multipleks PZR karışımı ile tekli PZR karışımı vortekslenerek homojen hale getirildi. Her örnek için numaralandırılmış steril 0,2 µl ince cidarlı PZR tüplerine 45 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı ve üzerine 5 µl DNA örneği eklenerek toplam hacim 50 µl'ye tamamlandı. Çalışmada *efaA* ve diğer virülans gen bölgelerinin amplifikasyonu yönelik uygulanan kullanılan PZR koşulları sırasıyla Tablo 14 ve Tablo 15'te yer almaktadır. Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezi yapıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Tablo 14. *efaA* virülans gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	2 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	35
Primer bağlanması (Annealing)	58	1dk	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1 dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	3 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

*: Jahansapas, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Heidarzadeh, S., Mardaneh, J., Mohammadzadeh, A., & Poursmaeil, O. (2022). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. isolated from traditional cheese types. *Ethiopian journal of health sciences*, 32(4), 799-808.

Tablo 15. Diğer virülans gen bölgelerinin amplifikasyonu için kullanılan PZR koşulları.

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Primer bağlanması (Annealing)	52 (Mix 1*) 58 (Mix 2**)	1dk	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1 dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	7 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

Mix 1: *asaI*, *ace*, *hyl* ve *cylA*, **Mix 2:** *esp*, *gelE* ve *ebp*
 *:Jahansapas, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Heidarzadeh, S., Mardaneh, J., Mohammadzadeh, A., & Pouresmaeil, O. (2022). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. isolated from traditional cheese types. *Ethiopian journal of health sciences*, 32(4), 799-808.
 **: Mohanty, S., & Behera, B. (2022). Antibioqram Pattern and Virulence Trait Characterization of Enterococcus Species Clinical Isolates in Eastern India: A Recent Analysis. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 237-246.

3.3.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, PZR ürünlerinin ayrıştırılması ve değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirildi. Bunun için 1,5 gr agaroz, 100 mL 1X TBE tampon çözeltisi içerisinde çözülünceye kadar karıştırıldı ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Tam bir çözünme sağlanmasının ardından karışım hafifçe çalkalanarak homojenizasyonu desteklendi. Soğuma aşamasında, karışıma 10 µL EtBr eklenerek homojen dağılımı sağlandı. Kabarcık oluşumuna dikkat edilerek jel, kuyucukları içeren döküm kalıbına aktarılıp taraklar yerleştirildi ve oda sıcaklığında yaklaşık 30-40 dakika bekletilerek jelin polimerize olması sağlandı.

Donma işlemi tamamlanan jelden taraklar dikkatlice çıkarıldı ve jel elektroferez tankına alındı. İlk veya son kuyucuğa DNA ladder yüklenerek referans bantların oluşturulması sağlandı. Daha sonra sükröz ve bromfenol mavisi içeren yükleme boyası ile karıştırılan örnekler, pipet yardımıyla dikkatlice jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroferez tankının kapağı kapatılıp elektrotlar uygun şekilde yerleştirildikten sonra güç kaynağına bağlanarak jel, 130 Volt ve 40 mA'de yaklaşık 45-60 dakika yürütüldü.

Jel yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, dikkatlice tanktan çıkarılarak Imager Eyes Capture jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV ışığı altında incelendi

ve PZR ürünlerine ait bantlar görüntüledi. Bant uzunlukları her bir PZR amplifikasyonu için ayrı ayrı değerlendirilerek, enterokok türlerinin ayırımı ve virülans faktör genlerinin varlığı belirlendi.

3.3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS statistics 20 programı kullanılmış olup, kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde Ki-kare (χ^2) testi ve gerekli durumlarda Fisher's Exact Test uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.



4.BULGULAR

4.1. İzolatların Özellikleri

Kasım 2023 - Nisan 2024 tarihleri arasında Kafkas Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen 99 Enterokok izolatu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan olguların 56'sı (%56,6) 65 yaş üzeri ve 50'si (%50,5) kadın olup, izolatların 70'i (%70,7) idrar örneklerinden elde edilmiştir. Hastaların yaş, cinsiyet ve örnek türüne ilişkin ayrıntılı dağılımları Tablo 16'da yer almaktadır.

Tablo 16: Hastaların Yaş, Cinsiyet ve Örnek Türüne Göre Dağılımı (n=99)

Özellik	Alt Grup	n (%)
Yaş Grubu	≤ 18	7 (7,1)
	19 – 45	12 (12,1)
	46 – 65	24 (24,2)
	≥ 66	56 (56,6)
Cinsiyet	Kadın	50 (50,5)
	Erkek	49 (49,5)
Örnek Türü	İdrar	70 (70,7)
	Kan	12 (12,1)
	Trakea sürüntüsü	7 (7,1)
	Abse sürüntüsü	4 (4,0)
	Vajen sürüntüsü	3 (3,0)
	Yara sürüntüsü	3 (3,0)

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 99 *Enterococcus* izolatının antimikrobiyal duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İzolatlar arasında en yüksek duyarlılık oranları teikoplanin ve vankomisin için %92,9 (92/99), linezolid için %88,9 (88/99) ve gentamisin için %82,7 (24/29) olarak belirlenmiştir. Diğer antibiyotiklere karşı duyarlılık oranları ise ampisilin %56,6 (56/99), siprofloksasin %47,1 (33/70), fosfomisin %65,7 (46/70), imipenem %77,1 (54/70), nitrofurantoin %68,5 (48/70) ve levofloksasin %74,2 (52/70) şeklindedir. İzolatların %70,7'si idrar

örneklerinden, %29,3'ü ise idrar dışı klinik örneklerden elde edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinin detaylı sonuçları Tablo 17'de bulunmaktadır.

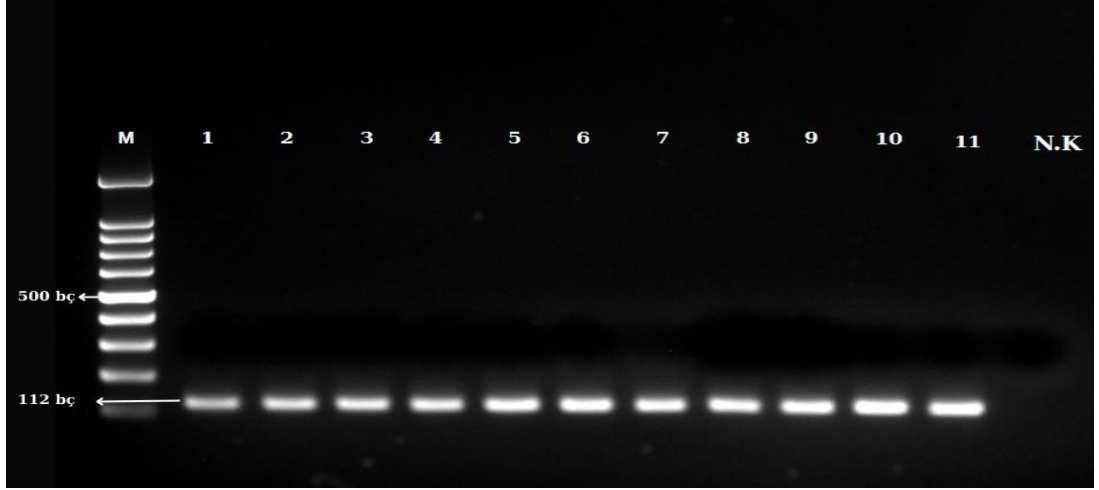
Tablo 17. Enterokok izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.

ANTİBİYOTİK	DUYARLI % (n)	DİRENÇLİ % (n)
Ampisilin	% 56,6 (56/99)	% 43,4 (43/99)
Siprofloksasin	% 47,1 (33/70)	% 52,9 (37/70)
Fosfomisin	% 65,7 (46/70)	% 34,2 (24/70)
İmipenem	% 77,1 (54/70)	% 22,8 (16/70)
Nitrofurantoin	% 68,5 (48/70)	% 31,4 (22/70)
Levofloksasin	% 74,2 (52/70)	% 25,7 (18/70)
Gentamisin	% 82,7 (24/29)	% 17,2 (5/29)
Teiklopanin	% 92,9 (92/99)	% 7,1 (7/99)
Vankomisin	% 92,9 (92/99)	% 7,1 (7/99)
Linezolid	% 88,9 (88/99)	% 11,1 (11/99)

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

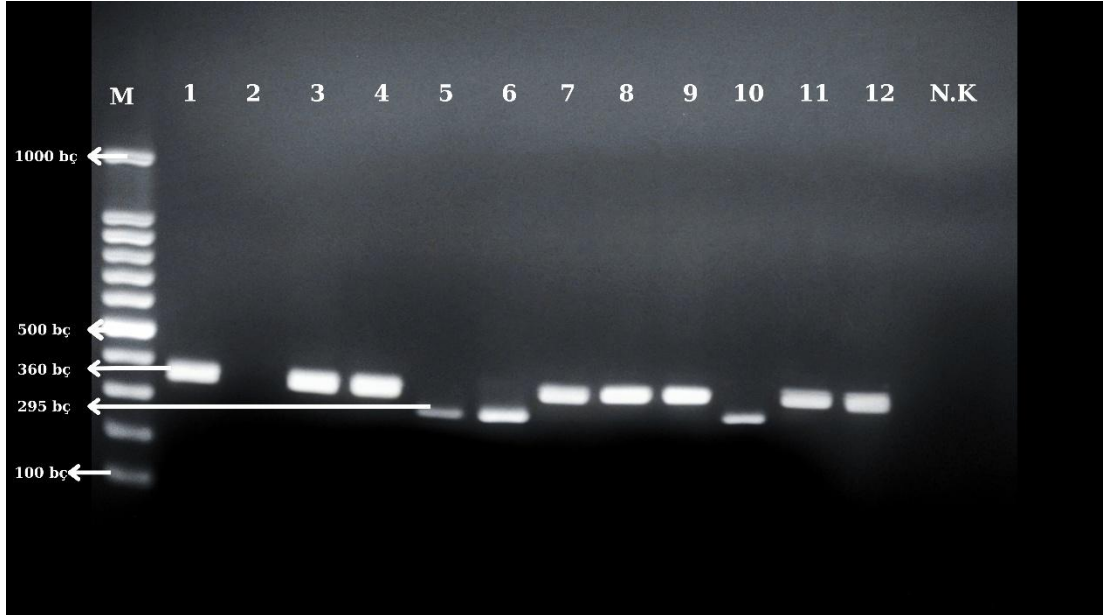
4.3.1. Enterokok Türlerinin Dağılımı

Çalışmada, fenotipik testlerle enterokok olarak tanımlanan toplam 99 klinik izolatta, PZR yöntemiyle doğrulama amaçlı *Enterococcus* genusuna özgü gen bölgesinin varlığı araştırıldı. Tüm izolatlarda, 112 bç uzunluğunda amplifikasyon ürünü veren *Enterococcus spp.* genel primeri ile pozitiflik saptandı. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesiyle elde edilen bantlar Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. *Enterococcus* Genusuna Özgü PZR Amplifikasyonlarının Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları. [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1- 5: 112 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon N.K: Negatif kontrol].

Moleküler düzeyde Enterokok olduğu doğrulanan klinik izolatlarda, tür düzeyindeki tanımlamaların yapılabilmesi amacıyla tür spesifik primerler kullanılarak yeniden PZR işlemi uygulandı. Bu moleküler tür tayininde, *E. faecalis* için 360 bç, *E. faecium* için 215 bç, *E. durans* için 295 bç ve *E. gallinarum* için 173 bç uzunluğundaki amplifikasyon ürünlerinin varlığı esas alınarak pozitiflikler saptandı. Enterokok izolatlarının tür dağılımına ilişkin bant paternleri Şekil 6'da gösterilmiştir.

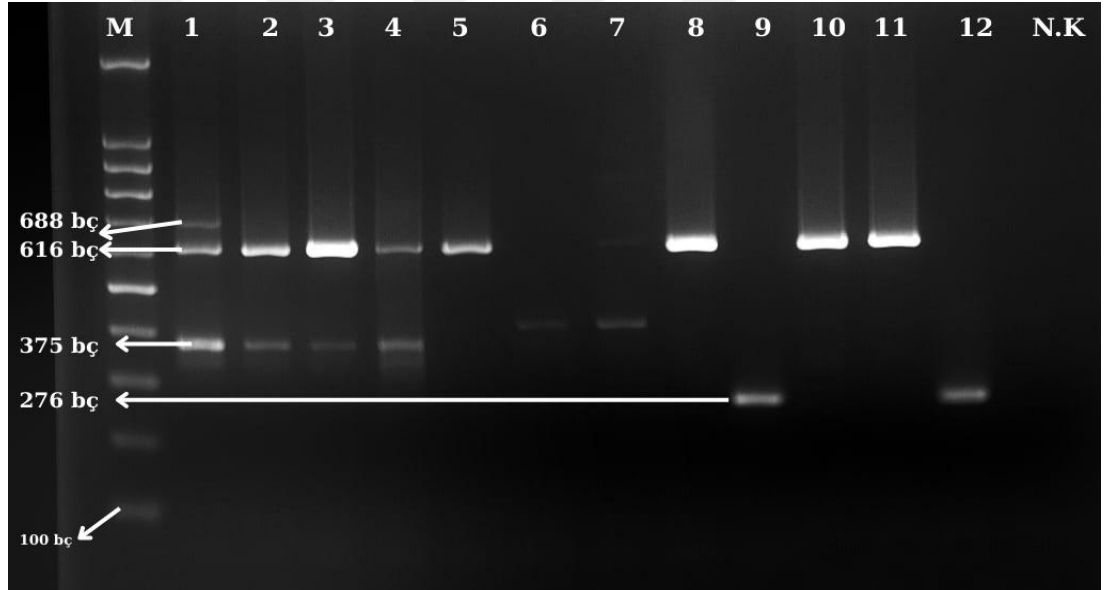


Şekil 6. *E. durans* (295 bç) ve *E. faecalis* (360 bç) Türlerine Ait PZR Bant Paternleri. [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1,3,4,7-9,10,11: 360 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 5,6,10: 295 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon N.K: Negatif kontrol].

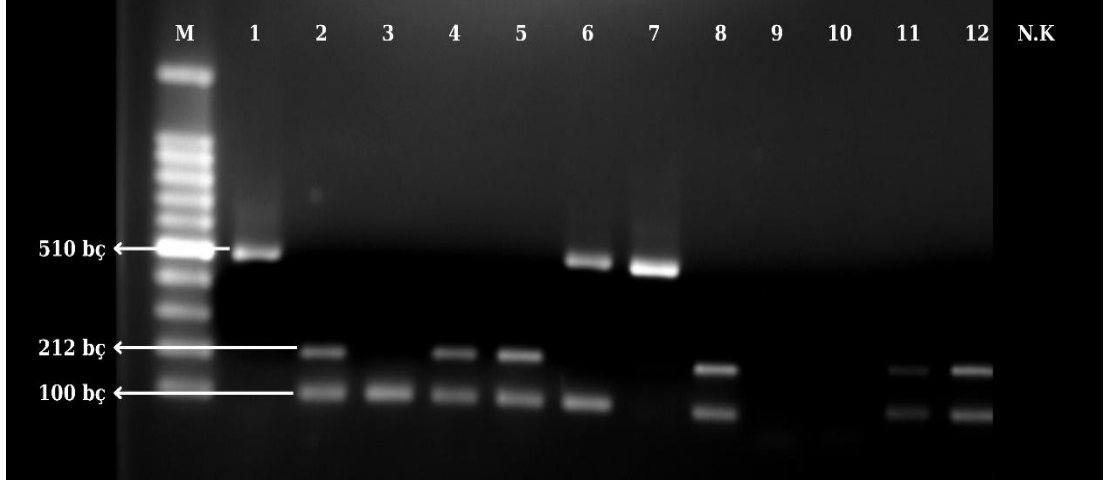
Tür düzeyindeki PZR analizleri sonucunda, toplam 99 enterokok izolatının %53,5'inin (n=53) *E. faecalis*, %35,4'ünün (n=35) *E. durans* olduğu belirlendi. Geri kalan %11,1'lik kısmın (n=11) ise bu çalışmada moleküler olarak incelenmeyen diğer enterokok türleri kapsamında değerlendirildi.

4.3.2. Virülans Faktör Genlerinin Dağılımı

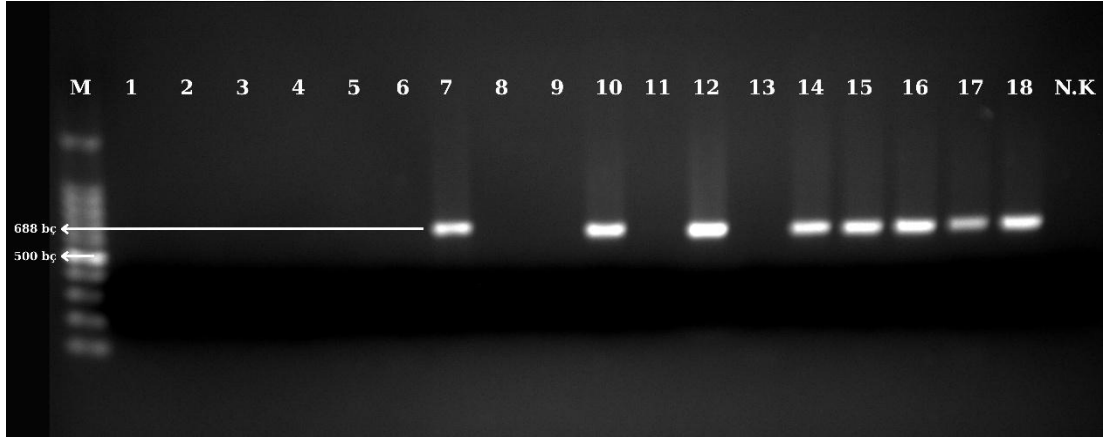
Tür düzeyinde tanımlanan enterokok izolatlarında, başlıca virülans faktör genlerinin varlığı iki ayrı multipleks PZR ve bir adet tekli PZR yöntemi ile araştırıldı. Analizlerde, *asa1* genine ait 375 bç, *ace* genine ait 616 bç, *hyl* genine ait 276 bç, *cylA* genine ait 688 bç, *esp* genine ait 510 bç, *gelE* genine ait 213 bç, *ebp* genine ait 100 bç ve *efaA* genine ait 688 bç uzunluğundaki amplifikasyon ürünlerinin varlığı dikkate alınarak pozitiflikler tespit edilmiştir. Enterokok izolatlarının virülans faktör gen bölgeleri Şekil 7, Şekil 8 ve Şekil 9'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Enterokok izolatlarının *asa1*, *ace*, *hyl* ve *cylA* virülans faktör gen bölgelerine ait PZR bant paternleri. [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1-5,7,8,10,11: 616 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 1:688 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 1-4,6,7: 375 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 9,12: 276 bç'lik amplifikasyon ürünleri, N.K: Negatif kontrol].



Şekil 8. Enterokok izolatlarının *esp*, *gelE* ve *ebp* virülans faktör gen bölgelerine ait PZR bant paternleri [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 1,6,7: 510 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 2,4,5,8,11,12:212 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon 2-6,8,11,12: 100 bç'lik amplifikasyon ürünleri, N.K: Negatif kontrol].



Şekil 9. Enterokok izolatlarının *efaA* virülans faktör gen bölgesine ait PZR bant paternleri [Kolon M: 100 bç'lik DNA moleküler ağırlık standardı, Kolon 7,10,12,14-18: 688 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kolon N.K: Negatif kontrol].

Yapılan moleküler analizler sonucunda, enterokok izolatlarının 84'ünde (%84,8) en az bir virülans geninin, 70'inde (%70,7) ise birden fazla virülans geninin varlığı tespit edildi. En sık saptanan virülans geni *efaA* olup, 52 izolat (%52,5) pozitif bulundu. Bunu sırasıyla *esp* geni 51 izolat (%51,5), *ace* geni 50 izolat (%50,5), *asaI* geni 43 izolat (%43,4), *ebp* geni 42 izolat (%42,4), *gelE* geni 33 izolat (%33,3), *cylA* geni 16 izolat (%16,2) ve *hyl* geni 13 izolat (%13,1) izledi.

Virülans genlerinin birlikte görülme durumları değerlendirildiğinde; *ace* ve *efaA* genlerinin birlikte pozitifliği 48 izolat (%48,5) ile en sık saptanan birliktelik olarak belirlendi. Bunu *esp* ve *efaA* genlerinin 33 izolat (%33,3), *ace* ve *asal* genlerinin 33 izolat (%33,3), *gelE* ve *efaA* genlerinin 32 izolat (%32,3) birlikteliği ile *ace* ve *gelE*, *ebp* ve *efaA* gen çiftlerinin her birinin 30 izolat (%30,3) birlikteliği takip etti.

4.4. Virülans Faktör Genleri ve Antibiyotik Duyarlılık Profilleri Arasındaki İlişkinin Analizi

Çalışmada enterokok izolatlarında tespit edilen *esp*, *ebp*, *gelE*, *ace*, *cylA*, *asal*, *hyl* ve *efaA* virülans genlerinin çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ile istatistiksel ilişkileri incelendi. *esp* pozitif izolatlarda siprofloksasin ($p=0,004$), fosfomisin ($p=0,004$), imipenem ($p=0,001$), nitrofurantoin ($p=0,005$), levofloksasin ($p=0,005$) ve gentamisin ($p=0,008$) duyarlılıkları açısından anlamlı fark saptandı. *ace* pozitif izolatlarda ampisilin ($p=0,006$), imipenem ($p=0,006$), gentamisin ($p=0,029$), vankomisin ($p=0,047$) ve linezolid ($p=0,023$) ile; *efaA* pozitif izolatlarda ise ampisilin ($p=0,007$), imipenem ($p=0,006$), vankomisin ($p=0,036$) ve linezolid ($p=0,002$) ile anlamlı ilişki belirlendi. *gelE* geni yalnızca linezolid ($p=0,013$) ve imipenem ($p=0,037$) için anlamlı fark gösterdi.

Buna karşılık *ebp*, *cylA*, *asal* ve *hyl* genlerinin varlığı ile antibiyotik duyarlılıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p>0,05$). Virülans faktör genleri ile antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 18'de yer almaktadır.

Tablo 18. Virülans faktör genleri ve antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel analizi.

Virülans gen	Antibiyotikler																	
	AMP			CIP			FOS			IPM			NIT					
	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P
Esp	24	27	0,453	24	19	0,004	17	26	0,003	12	31	0,001	13	30	0,005			
Ebp	16	26	0,358	17	12	0,773	11	18	0,890	5	24	0,738	9	20	0,989			
GelE	10	23	0,062	12	15	0,080	8	19	0,135	3	24	0,037	7	20	0,142			
Ace	15	35	0,006	18	21	0,072	14	25	0,188	4	35	0,006	9	30	0,062			
CylA	5	11	0,283	9	2	0,126	3	8	0,848	1	10	0,542	1	10	0,247			
Asa1	16	27	0,274	16	14	0,999	8	22	0,463	4	26	0,332	10	20	0,900			
Hyl	8	5	0,158	6	2	0,374	5	3	0,199	3	5	0,436	1	7	0,426			
EfaA	16	36	0,007	19	21	0,128	15	25	0,222	4	36	0,006	9	31	0,065			
Virülans gen	LVX			GEN			TEC			VAN			LZD					
Esp	11	32	0,005	2	6	0,008	3	48	0,408	3	48	0,634	4	47	0,286			
Ebp	7	22	0,989	1	11	0,563	4	38	0,651	3	39	0,981	6	36	0,388			
GelE	4	23	0,052	0	5	0,061	1	32	0,192	0	33	0,052	0	33	0,013			
Ace	7	32	0,066	0	10	0,029	3	47	0,443	1	49	0,047	2	48	0,023			
CylA	4	7	0,617	0	4	0,601	0	16	0,195	0	16	0,228	1	15	0,499			
Asa1	8	22	0,943	1	11	0,550	4	39	0,696	3	40	0,975	5	38	0,886			
Hyl	3	5	0,550	0	5	0,336	1	12	0,956	1	12	0,925	3	10	0,141			
EfaA	7	33	0,072	1	10	0,118	3	49	0,375	1	51	0,036	1	51	0,002			

➤ Koyu renkle belirtilen hücreler, ilgili değişkenler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanan karşılaştırmaları göstermektedir.
 ➤ AMP: Ampisilin, CIP: Siprofloksasin, FOS: Fosfomisin, IPM: İmpenem, NIT: Nitrofurantoin, LVX: Levofloksasin, GEN: Gentamisin, TEC: Teikoplanin, VAN: Vankomisin, LZD: Linezolid, TGC: Tigesiklin.
 ➤ R: dirençli, S: duyarlı

4.5. Enterokok Türleri ve Antibiyotik Duyarlılık Profilleri Arasındaki İlişkinin Analizi

Çalışmadan elde edilen verilere göre, enterokok izolatlarının tür düzeyinde (*E. faecalis* ve *E. durans*) çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık profilleri değerlendirildi. Ampisilin ve imipenem açısından türler arasında anlamlı farklılıklar saptandı. Ampisilin için yapılan analizde, *E. faecalis* izolatlarının %71,7'sinin (n=38) duyarlı, %28,3'ünün (n=15) dirençli olduğu belirlenirken; *E. durans* izolatlarında ise duyarlılık oranı %40,5 (n=15), direnç oranı %59,5 (n=22) olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,005). Benzer şekilde imipenem duyarlılığı açısından da *E. faecalis* izolatlarının %92,5'inin (n=37) duyarlı olduğu, buna karşın *E. durans* izolatlarında bu oranın %56,0 (n=14) düzeyinde kaldığı görüldü. Bu farklılık da istatistiksel açıdan anlamlıydı (p=0,003).

Diğer antibiyotikler (siprofloksasin, fosfomisin, nitrofurantoin, gentamisin, teikoplanin, vankomisin, linezolid ve levofloksasin) yönünden ise *E. faecalis* ve *E. durans* izolatlarının duyarlılık/direnç dağılımlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p>0,05). Çalışmadan izole edilen enterokok türleri ve antibiyotik duyarlılıkları arasındaki ilişkilere yönelik ayrıntılı istatistiksel bulgular Tablo 19'da yer almaktadır.

Tablo 19. Enterokok türleri ve antibiyotik duyarlılıklarının istatistiksel analizi.

Türler	Antibiyotikler														
	AMP			CIP			FOS			IPM			NIT		
	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P
<i>E. durans</i>	22	15		14	11		8	17		11	14		11	14	
<i>E. faecalis</i>	15	38	0,005	21	19	0,445	15	25	0,411	3	37	0,003	10	30	0,113
Diğer	6	3		2	2		1	3		1	3		0	4	
Antibiyotikler															
Türler	GEN			TEC			VAN			LZD			LVX		
	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P
	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P	R (n)	S (n)	P
<i>E. durans</i>	3	9		3	34		4	33		5	32		8	17	
<i>E. faecalis</i>	2	10	0,144	5	48	0,631	3	50	0,442	5	48	0,832	8	32	0,304
Diğer	0	5		0	9		0	9		1	8		1	3	

*R: Dirençli

*S: Duyarlı

4.6. Enterokok Türleri ve Virülans Faktör Genleri Arasındaki İlişkinin Analizi

Çalışmada enterokok türleri ile sekiz farklı virülans geninin (*esp*, *ebp*, *gelE*, *ace*, *cylA*, *asa1*, *hyl* ve *efaA*) dağılımı arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelendi. Yapılan analizler sonucunda *esp*, *ebp*, *gelE*, *ace*, *cylA*, *asa1* ve *efaA* genlerinin dağılımlarının enterokok türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi. Özellikle *E. faecalis* izolatlarında bu virülans genlerinin pozitiflik oranlarının *E. durans* ve diğer türlere kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edildi.

E. faecalis izolatlarında, *esp* geninin anlamlı şekilde daha sık saptandığı görüldü ($p=0,032$). Benzer şekilde, *ebp* ($p=0,002$) ve *gelE* ($p=0,002$) genleri de *E. faecalis*'te daha yüksek oranlarda pozitif bulundu. Hemolizin üretiminden sorumlu *cylA* geni ($p=0,002$) ile yüzey proteinlerini kodlayan *asa1* geni ($p=0,003$) de *E. faecalis* izolatlarında belirgin olarak daha fazla saptandı. Ayrıca *ace* ve *efaA* genlerinin dağılımında *E. faecalis* izolatlarında sırasıyla %77,4 (41/53) ve %79,2 (42/53) oranında pozitiflik saptanırken, *E. durans* izolatlarında bu oranlar *ace* için %21,6 (8/37) ve *efaA* için %24,3 (9/37) olarak belirlendi; bu farklılıkların istatistiksel olarak oldukça anlamlı olduğu gösterildi ($p=0,000$). Buna karşın *hyl* geninin türler arasında dağılımında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,148$). Enterokok türleri ile virülans faktör genleri arasındaki ilişkilere dair ayrıntılı istatistiksel değerlendirmeler Tablo 20'de yer almaktadır.

Tablo 20. Enterokok türleri ve virülans faktör genlerinin istatistiksel analizi.

Türler	Esp (+)	Esp (-)	P	Ebp (+)	Ebp (-)	P	GelE (+)	GelE (-)	P	Ace (+)	Ace (-)	P
Diğer	1	8	0,032	2	7	0,002	1	8	0,002	1	8	0
<i>E. durans</i>	19	18		9	28		6	31		8	29	
<i>E. faecalis</i>	31	22		31	22		26	27		41	12	
Türler	CylA (+)	CylA (-)	P	asa1 (+)	asa1 (-)	P	Hyl (+)	Hyl (-)	P	EfaA (+)	EfaA (-)	P
Diğer	0	9	0,002	1	8	0,003	1	8	0,148	1	8	0
<i>E. durans</i>	1	36		11	26		8	29		9	28	
<i>E. faecalis</i>	15	38		31	22		4	49		42	11	

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, Kars ilinde farklı klinik örneklerden izole edilen toplam 99 enterokok izolatının tür düzeyinde tanımlanması, antibiyotik duyarlılık profilleri ile başlıca virülans genlerinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. İncelenen izolatların büyük çoğunluğunun idrar örneklerinden (n=70) izole edildiği; bunu sırasıyla kan (n=9), trakeal aspirat (n=7), abse (n=5), vajen (n=4) ve yara (n=4) örneklerinin izlediği belirlenmiştir. Tür düzeyinde yapılan değerlendirmede izolatların %53,3'ünün (n=53) *E. faecalis*, %35,3'ünün (n=35) *E. durans* olduğu; %11,3'lük kısmının (n=11) ise diğer enterokok türleri içerisinde yer aldığı saptanmıştır. Bu dağılım, özellikle *E. faecalis*'in bölgedeki klinik örneklerde baskın tür olarak öne çıktığını göstermektedir.

Çalışmamızın bulguları, farklı coğrafi bölgelerde yürütülen çalışmaların sonuçlarıyla genel olarak paralellik göstermektedir. Ödemiş ve arkadaşları (2018), Türkiye genelinde yürüttükleri çalışmalarında 390 enterokok izolatını incelemiş ve bu izolatların %40'ının *E. faecalis* olduğunu bildirmişlerdir. Baysal (2016) ise 121 enterokok izolatını değerlendirdiği çalışmasında bu oranın %73 olduğunu saptayarak, *E. faecalis*'in klinik örneklerde baskın tür olarak öne çıktığını ortaya koymuştur. Bu veriler, çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu bir tablo sergilemektedir. Dünya genelinde farklı bölgelerde gerçekleştirilen araştırmalar da benzer bulgular sergilemektedir. Mubarak ve arkadaşları (2024), Mısır'da yürüttükleri araştırmada izole ettikleri 41 enterokok izolatının %75,6'sını *E. faecalis* olarak tanımlayarak bu türün baskınlığını vurgulamışlardır. Sannathimmappa ve arkadaşları (2023) tarafından Gürcistan'da gerçekleştirilen çalışmada da benzer şekilde 132 enterokok izolatının %68'inin *E. faecalis* olduğu rapor edilmiştir. Nair ve arkadaşları (2024) ise Hindistan'da yürüttükleri araştırmada 90 enterokok izolatının %70'inin *E. faecalis*'e ait olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, Muriqi ve arkadaşları (2016), 200 enterokok izolatını inceledikleri çalışmalarında *E. faecalis*'in %45 oranıyla baskın tür olduğunu bildirmişlerdir. Tüm bu veriler, çalışmamızın bulgularını destekler niteliktedir.

Çalışmamızda *E. durans*'ın %35,3 gibi önemli bir oranda tespit edilmiş olması, araştırmamızı literatürdeki mevcut bulgulardan farklı kılan dikkat çekici bir özellik olarak öne çıkmaktadır. Örneğin, Muriqi ve arkadaşlarının (2016) çalışmasında *E.*

durans izolatına rastlanmamış; bunun yerine %2,5 oranında *E. gallinarum* ve %1 oranında *E. avium* türleri izole edilmiştir. Bu durum, enterokokların tür dağılımlarının coğrafi özellikler, örnek tipleri ve bölgesel epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Calzada ve arkadaşları (2017) tarafından İspanya ve Uganda'da gerçekleştirilen çok merkezli bir çalışmada da bu farklılıklara dikkat çekilmiştir. İspanya'da *E. faecalis*'in (%92,7), Uganda'da ise *E. faecium*'un (%65,3) baskın tür olarak belirlendiği rapor edilmiştir. Söz konusu farklılıkların örnek tipi, coğrafi bölge, hasta profili ve uygulanan hastane enfeksiyon kontrol politikaları gibi çeşitli etmenlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Enterokoklar, özellikle çoklu antibiyotik direnci göstermeleri nedeniyle önemli nozokomiyal patojenlerdir. Bu çalışmada, antibiyotik duyarlılık bulguları literatür verileriyle birlikte değerlendirilmiş ve olası farklılıklar açıklanmıştır. Çalışmada en yüksek antibiyotik duyarlılığı teikoplanin ve vankomisin (%92,9), linezolid (%88,9) ve gentamisin (%82,7) ajanlarına karşı gözlenmiştir. En yüksek direnç ise siprofloksasin (%52,8) ve ampisilin (%43,4) için belirlenmiştir.

Literatür ile karşılaştırıldığında, Bahçeci ve ark. (2023), yalnızca idrar örneklerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarında siprofloksasin ve levofloksasine %32,8, imipeneme %33,2 ve gentamisine %23,5 oranında direnç bildirmiştir. Benzer şekilde Sengupta ve ark. (2023), Hindistan'ın Kalküta kentinde 239 *E. faecalis* izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada ampisiline %30,1, siprofloksasine %27,2 ve levofloksasine %28,9 duyarlılık saptamıştır. Bu oranlar, çalışmamızda elde edilen ampisilin (%43,4 direnç) ve siprofloksasin (%52,8 direnç) verileriyle paralellik göstermektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda gentamisin duyarlılığı %82,8 ile oldukça yüksek bulunmuş olup, Sengupta ve ark.'nın bildirdiği %59,4'lük orana kıyasla daha olumlu bir tablo ortaya koymaktadır. Bu durum, bölgemizde aminoglikozidlerin daha sınırlı kullanımına bağlı olabildiğini düşündürmektedir.

Georges ve ark. (2022), Kenya'da 44 enterokok izolatını kapsayan araştırmalarında, tüm izolatların eritromisine dirençli olduğunu; ancak teikoplanin, vankomisin ve linezolid gibi ajanlara karşı yüksek düzeyde duyarlılık gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca nitrofurantoin (%90), ampisilin (%84,1) ve gentamisin (%63,6) için yüksek duyarlılık oranları rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızda linezolid, teikoplanin, gentamisin ve vankomisin için gözlenen yüksek duyarlılık oranlarıyla

örtüşmekte, ampisilin açısından ise bölgesel farklılıkları yansıtmaktadır. Labecka ve ark. (2024), Letonya'nın Riga kentinde yürüttükleri çalışmada 140 enterokok izolatını değerlendirmiş ve linkozamid (%100), tetrasiklin (%78), aminoglikozid (%77) ve penisilin (%90) grubu antibiyotiklere karşı yüksek direnç oranları raporlamıştır. Bizim sonuçlarımız bu eğilimlerle kısmen örtüşmekle birlikte özellikle florokinolon ve beta-laktam gruplarında daha yüksek direnç göstermektedir.

Sannathimmappa ve ark. (2023), Gürcistan'da 132 enterokok izolatını içeren çalışmalarında, özellikle beta-laktam (ampisilin) ve florokinolon (siprofloksasin, levofloksasin) grubu antibiyotiklere karşı %40–60 aralığında direnç oranları bildirmiştir. Buna karşın, glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı yüksek duyarlılığın korunmuş olması, bu ajanların etkinliğini sürdürdüğünü göstermektedir. Bu sonuçlar, çalışmamızda ampisilin (%43,4) ve siprofloksasin (%52,8) için belirlenen direnç oranlarıyla uyumlu olup, vankomisin ve teikoplanin (%92,9) duyarlılıklarımızla da örtüşmektedir.

Bazı çalışmalar ise direnç düzeyleri açısından ciddi farklılıklar göstermiştir. Örneğin, Şimşek (2019) çalışmasında ampisilin (%10,6) ve siprofloksasin (%37,5) için çok daha düşük direnç oranları bildirmiştir. Boccella ve ark. (2021) ise İtalya'da yaptıkları çalışmada vankomisin, ampisilin ve imipeneme karşı %2'nin altında direnç oranları saptamışlardır. Bu farklılıkların; coğrafi varyasyonlar, antibiyotik kullanım alışkanlıkları ve hastane bazlı politikalarla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Virülans genleri, bakterilerin konak hücreye tutunma, invazyon, toksisite ve biyofilm oluşumu gibi patojenite özelliklerini belirlemede temel belirleyicilerdir. Bu nedenle, izolatlarda saptanan virülans genlerinin dağılımı ve bu genlerle direnç ilişkileri detaylı şekilde ele alınmıştır. Çalışmamızda sekiz farklı virülans geni taranmış; bunlar arasında *esp* (%51,5), *efaA* (%53,5) ve *ace* (%42,4) genleri en sık tespit edilenler olmuştur. Ayrıca *ebp*, *asa1* ve *gelE* genleri %33–42 aralığında pozitif bulunurken, hemolizin (*cylA* %16,1) ve *hyl* (%14,1) genleri daha düşük sıklıkta tespit edilmiştir. İzolatların %88,9'unda en az bir, %75,7'sinde ise birden fazla virülans geni bulunması, bu bakterilerin yüksek patojenik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Literatür verileriyle karşılaştırıldığında, Samani ve ark. (2021) *E. faecalis* izolatlarında en sık *efaA* (%86,7), *gelE* (%66,7), *asa1* (%58,3), *esp* (%53,3), *cylM*

(%46,7) ve *agg* (%30) genlerini rapor etmiş ve özellikle *esp* ile *efaA* genlerinin ön planda olduğunu vurgulamıştır. Benzer şekilde Fahmy ve ark. (2021), Gürcistan'da yürüttükleri çalışmada *esp* (%80,8), *asaI* (%84,6), *gelE* (%73,1), *hyl* (%38,5) ve *cylA* (%30,8) oranlarını bildirmiştir. Bu oranlar, çalışmamızda saptanan değerlerden genel olarak daha yüksek bulunmuştur. Ancak *esp* ve *asaI* genlerinin her iki çalışmada da baskın olarak tespit edilmesi, bu genlerin coğrafyadan bağımsız şekilde yaygın virülans faktörleri olduğunu düşündürmektedir.

Calzada ve ark. (2017), Uganda ve İspanya'daki enterokok izolatlarını inceledikleri çok merkezli bir araştırmada *ace*, *efaA*, *agg* ve *cpd* genlerini en sık görülen virülans faktörleri olarak rapor etmiştir. İlginç olarak *esp* geni İspanya'da oldukça düşük (%2), Uganda'da ise %43 oranında bildirilmiştir. Bu bulgu, *esp* geninin dağılımında belirgin bölgesel farklılıkların varlığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda *esp* oranı %51,5 olarak belirlenmiş olup bu değer hem İspanya'daki hem de Uganda'daki oranların üzerinde seyretmekte ve genin klinik önemini desteklemektedir.

Georges ve ark. (2022), Kenya'daki izolatlarda *gelE* (%61,4), *asaI* (%59,1), *esp* (%36,3), *cylA* (%25) ve *hyl* (%2,3) genlerini rapor etmiştir. Bu veriler, çalışmamızla karşılaştırıldığında *gelE* ve *asaI* genlerinin benzer oranlarda bulunduğunu, ancak *esp* ve *cylA* genlerinin daha düşük düzeylerde saptandığını göstermektedir. Bu farklılıkların, coğrafi bölgelere özgü suş çeşitliliği, klinik örneklerin kaynakları ve hasta popülasyonlarının özellikleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Antibiyotik direnç profili ile virülans genleri arasındaki istatistiksel anlamlılık ilişkilerinin ortaya konması, enfeksiyonların klinik seyrini ve tedaviye yanıtı etkileyebilecek moleküler faktörlerin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, *esp* geninin *E. durans* izolatlarında daha yaygın olduğu ($p=0,032$), *ace* ($p=0,000$), *efaA* ($p=0,000$) ve *gelE* ($p=0,002$) genlerinin ise *E. faecalis* ile anlamlı düzeyde ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *ace* geni ile ampisilin ($p=0,006$), imipenem ($p=0,006$), gentamisin ($p=0,029$), vankomisin ($p=0,047$) ve linezolid ($p=0,023$); *efaA* geni ile ise ampisilin ($p=0,007$), imipenem ($p=0,006$), vankomisin ($p=0,036$) ve linezolid ($p=0,002$) dirençleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar saptanmıştır. Bu bulgular, virülans faktörlerinin yalnızca enfeksiyonun

şiddetini belirlemekle kalmayıp, aynı zamanda antibiyotik direnç mekanizmalarıyla da ilişkili olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde Georges ve ark. (2022), Kenya’da *esp*, *gelE* ve *asal* genleri ile ampisilin, nitrofurantoin ve tetrasiklin direnci arasında anlamlı ilişkiler tanımlamış; Ghazvinian ve ark. (2024) ise *E. faecalis* izolatlarında *esp*, *ace* ve *efaA* genlerinin hem tür düzeyinde hem de antibiyotik direnciyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu veriler, enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde yalnızca antibiyotik duyarlılığına değil, aynı zamanda genetik virülans yapısına da dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koymakta ve bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımları için moleküler düzeyde değerlendirme yapılmasının önemini vurgulamaktadır.

Virülans genlerinin dağılımına bakıldığında, izolatların büyük kısmında bir veya birden fazla virülans geninin bulunduğu görülmüştür. Özellikle *esp*, *efaA* ve *ace* genlerinin yüksek oranlarda tespit edilmesi, izolatların konak hücreye tutunma, invazyon ve biyofilm oluşturma gibi enfeksiyon dinamiklerinde etkin roller üstlendiğini göstermektedir. Ayrıca bazı virülans genleri ile belirli antibiyotik dirençleri arasında saptanan istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler, patojenitenin sadece konak faktörleriyle değil, aynı zamanda direnç mekanizmalarıyla da şekillendiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, virülans ve direnç genetiklerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda, benzer çalışmalarda daha geniş örneklem grupları ve farklı coğrafi bölgelerden verilerle desteklenen karşılaştırmalı analizler yapılması önerilmektedir. Ayrıca, tür tayini ve genetik analizlerde moleküler yöntemlerin rutin uygulamalara entegrasyonu, enfeksiyon kontrolü ve uygun tedavi yönetimi açısından büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma bölgesel düzeyde enterokok türlerinin klinik önemine, direnç özelliklerine ve virülans potansiyeline ışık tutarak, enfeksiyon hastalıklarının tanı ve tedavisinde referans teşkil edebilecek nitelikte bir kaynak sunmaktadır. Bulgular, hem lokal sağlık politikalarının belirlenmesine katkı sağlamakta hem de daha geniş çaplı epidemiyolojik araştırmalara zemin oluşturmaktadır.

Elde edilen bulgular, enterokokların yalnızca klinik enfeksiyonların değil, aynı zamanda toplum sağlığı, hayvansal üretim ve çevresel ekosistemlerin de ortak bir sorunu olduğunu ortaya koymaktadır. Enterokokların gastrointestinal florada doğal olarak bulunmaları ve hayvanlardan insanlara ya da çevreye kolayca taşınabilmeleri, antibiyotik direncinin küresel ölçekte yönetiminde Tek Sağlık (One Health)

yaklaşımının zorunluluğunu göstermektedir. Güncel çalışmalar, özellikle veterinerlik ve tarım alanında antibiyotiklerin yoğun kullanımının, dirençli enterokokların gıda zinciri ve çevresel kaynaklar aracılığıyla yayılımında kritik rol oynadığını vurgulamaktadır (Murray et al., 2023; Tyson et al., 2023). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (WOAH/OIE) de antimikrobiyal dirençle mücadelede insan, hayvan ve çevre sağlığını kapsayan entegre stratejilerin hayata geçirilmesinin zorunlu olduğunu bildirmektedir (WHO, 2021; FAO & WHO, 2022). Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen veriler yalnızca bölgesel direnç takibine katkı sunmakla kalmamakta; aynı zamanda enterokokların neden olduğu enfeksiyonların Tek Sağlık perspektifi ile değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Böylelikle antibiyotiklerin rasyonel kullanımı, direnç izleme programlarının güçlendirilmesi ve disiplinler arası uluslararası iş birlikleri aracılığıyla sürdürülebilir bir direnç yönetimi mümkün olabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Abdel-Gawad, A. R., Rezk, G. A. E. G., & Mahmoud, E. A. R. (2021). Characterization of Enterococci isolated from intensive care unit (ICU); Distribution of virulence markers, virulence genes and antibiotic resistance pattern. *Microbes and Infectious Diseases*, 2(4), 725-735.
2. Ada, İ. *Deniz suyundan izole edilen Enterokok suşlarının virulans faktörlerinin incelenmesi* (doktora tezi). İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul;2019.
3. Akçimen B. Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Vankomisin Dirençli Enterokokların Pulsed Field Jel Elektrophoresis Yöntemiyle Genotip Tayini [uzmanlık tezi]. ÇÜ, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Adana: 2010.
4. Akdemir, Y. (2010). *Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnç Profiline Saptanması* (Master's thesis, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
5. Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
6. Ayhan, Ş. (2021). *Aksaray'da üretilen tulum peynirlerinde Enterococcus cinsi bakterilerinin izolasyonu PZR yöntemi ile tanımlanması ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi* (Master's thesis, Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
7. Baghdayan, A. S., Shankar, N., & Tendolkar, P. M. (2003). Pathogenic enterococci: New developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(12), 2622-2636.
8. Baylan, I. O. (2019). ENTEROKOK ENFEKSİYONLARINDA İMMÜNOPATOGENEZ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ. *Nobel Medicus Journal*, 15(2).
9. Baysal Ş. Enterokokların Virülans Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması ve Antibiyotik Direnci ile İlişkinin Değerlendirilmesi [uzmanlık tezi]. SBÜ, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği; Ankara: 2019.
10. Ben Braïek, O., & Smaoui, S. (2019). Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed research international*, 2019(1), 5938210.
11. Bin-Asif, H., & Ali, S. A. (2019). The genus Enterococcus and its associated virulent factors. In *Microorganisms*. IntechOpen.
12. Boccella, M., Santella, B., Pagliano, P., De Filippis, A., Casolaro, V., Galdiero, M., ... & Franci, G. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance of Enterococcus species: a retrospective cohort study in Italy. *Antibiotics*, 10(12), 1552.
13. Cairns, K. A., Udy, A. A., Peel, T. N., Abbott, I. J., Dooley, M. J., & Peleg, A. Y. (2023). Therapeutics for vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infections. *Clinical microbiology reviews*, 36(2), e00059-22.
14. Carbone, A., Lieu, A., Mouhat, B., Santelli, F., Philip, M., Bohbot, Y., ... & Habib, G. (2020). Spondylodiscitis complicating infective endocarditis. *Heart*, 106(24), 1914-1918.
15. Carrasco Calzada, F., Jairo Aguilera, J., Moreno, J. E., Cuadros González, J., Roca Biosca, D., Prieto-Pérez, L., & Pérez-Tanoira, R. (2023). Differences in virulence factors and antimicrobial susceptibility of uropathogenic enterococcus spp. Strains in a rural area of Uganda and a spanish secondary hospital. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(5), 282.
16. Carvalhaes, C. G., Sader, H. S., Streit, J. M., Castanheira, M., & Mendes, R. E. (2022). Activity of oritavancin against Gram-positive pathogens causing bloodstream infections in the United States over 10 years: focus on drug-resistant enterococcal subsets (2010–2019). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(2), e01667-21.
17. Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 686-707. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.686>
18. Clewell, D. B., Francia, M. V., Flannagan, S. E., & An, F. Y. (2002). Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the Staphylococcus aureus issue. *Plasmid*, 48(3), 193-201. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00113-0)
19. Corey, G. R., Kollef, M. H., Shorr, A. F., Rubinstein, E., Stryjewski, M. E., Hopkins, A., & Barriere, S. L. (2014). Telavancin for hospital-acquired pneumonia: clinical response and 28-day survival. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(4), 2030-2037.

20. Çağaşar Ö. Kolonize Vankomisin Dirençli Enterokok Suşlarında Linezolid Ve Tigesiklinin İn-Vitro Aktiviteleri [uzmanlık tezi]. FÜ, Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Elazığ:2010.
21. Çelik, Ü., & Alhan, E. (2008). Pediatrik Enfeksiyonlarda Zorlu Patojen: Enterokoklar/A Difficult Pathogen in Pediatric Infections: Enterococcus. *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, 2(2), 58.
22. Dubin, K., & Pamer, E. G. (2017). Enterococci and their interactions with the intestinal microbiome. *Microbiology spectrum*, 5(6), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bad-0014-2016>
23. Dunny, G. M., & Berntsson, R. P. A. (2016). Enterococcal sex pheromones: evolutionary pathways to complex, two-signal systems. *Journal of bacteriology*, 198(11), 1556-1562.
24. FAO & WHO. FAO/WHO International Food Safety Authorities Network (INFOSAN): Addressing antimicrobial resistance through a One Health approach. FAO/WHO, 2022.
25. Fiore, E., Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2019). Pathogenicity of enterococci. *Microbiology spectrum*, 7(4), 10-1128.
26. Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
27. Gaca, A. O., & Lemos, J. A. (2019). Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83(3), 10-1128.
28. García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The Enterococcus: A Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00058-18.
29. Garsin, D. A., Frank, K. L., Silanpää, J., Ausubel, F. M., Hartke, A., Shankar, N., & Murray, B. E. (2014). Pathogenesis and models of enterococcal infection. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*.
30. Genez H. Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokokların Virulans Faktörlerinin Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnciyle İlişkilendirilmesi [uzmanlık tezi]. KÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Kocaeli:2021.
31. Georges, M., Odoyo, E., Matano, D., Tiria, F., Kyany'a, C., Mbwika, D., ... & Musila, L. (2022). Determination of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium antimicrobial resistance and virulence factors and their association with clinical and demographic factors in Kenya. *Journal of pathogens*, 2022(1), 3129439.
32. Geraldes, C., Tavares, L., Gil, S., & Oliveira, M. (2022). Enterococcus virulence and resistant traits associated with its permanence in the hospital environment. *Antibiotics*, 11(7), 857.
33. Ghazvinian, M., Asgharzadeh Marghmalek, S., Gholami, M., Amir Gholami, S., Amiri, E., & Goli, H. R. (2024). Antimicrobial resistance patterns, virulence genes, and biofilm formation in enterococci strains collected from different sources. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 274.
34. Goh, H. S., Yong, M. A., Chong, K. K. L., & Kline, K. A. (2017). Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. *Virulence*, 8(8), 1525-1562.
35. Guzman Prieto, AM, van Schaik, W., Rogers, MR, Coque, TM, Baquero, F., Corander, J., & Willems, RJ (2016). Enterokokların hastane patojenleri olarak küresel olarak ortaya çıkışı ve yayılması: Klonların saldırısı?. *Mikrobiyoloji alanındaki sınırlar* , 7 , 788.
36. Hassan, M. M., & Belal, E. S. B. (2016). Antibiotic resistance and virulence genes in enterococcus strains isolated from different hospitals in Saudi Arabia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(4), 726-732.
37. Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421-569. <https://doi.org/10.4161/viru.21282>
38. Isnard C. Enterococcus spp.: entre pathogènes opportunistes et probiotiques [doktora tezi]. Normandie üniversitesi, 2017.
39. Isnard, C. (2017). *Enterococcus spp.: entre pathogènes opportunistes et probiotiques* (Doctoral dissertation, Normandie Université).
40. Jahansepas, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Heidarzadeh, S., Mardaneh, J., Mohammadzadeh, A., & Poursmaeil, O. (2022). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus spp.* isolated from traditional cheese types. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 32(4), 799–808. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v32i4.17>

41. Kalfopoulou, E., & Huebner, J. (2020). Advances and Prospects in Vaccine Development against Enterococci. *Cells*, 9(11), 2397. <https://doi.org/10.3390/cells9112397>
42. Kandemir S. Enterokoklara Bağlı Kan Akımı Enfeksiyonlarında Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi [uzmanlık tezi]. Trakya üni. Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı; Edirne:2012.
43. Kaziwe, S. Detection of Vancomycin resistant Enterococci from clinical specimens at University Teaching Hospitals [doktora tezi]. Zambia üniversitesi, 2019.
44. Khan, A., Miller, W. R., Axell-House, D., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2022). Antimicrobial susceptibility testing for enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(9), e00843-21.
45. Krause, Alexandra L., Timothy P. Stinear, and Ian R. Monk. "Barriers to genetic manipulation of Enterococci: Current approaches and future directions." *FEMS Microbiology Reviews* 46.6 (2022): fuac036.
46. Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M., & Michalik, M. (2021). The many faces of *Enterococcus* spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms*, 9(9), 1900.
47. Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(1), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.004>
48. Labecka, L., Ķibilds, J., Cīrulis, A., Čeirāne, E. D., Zeltiņa, I., Reinis, A., ... & Krūmiņa, A. (2024). Evaluation of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Enterococcus* spp. Obtained from Hospital Patients in Latvia. *Medicina*, 60(6), 850.
49. Leclercq, R., & Courvalin, P. (2008). Antibiotic resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), 2107–2111.
50. Mahalleh, A., & Göncüoğlu, M. (2017). Antibiotic Resistance in Enterococci and the Importance of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 8(1), 7-13.
51. Mete, E., Kaleli, İ., Cevahir, N., Demir, M., Akkaya, Y., & Kiriş Satılmış, Ö. (2017). Enterokok türlerinin virulans faktörlerinin araştırılması [Evaluation of virulence factors in *Enterococcus* species]. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 51(2), 101–114.
52. Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(10), 1221-1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>
53. Mischnek, A., Werner, G., Bender, J., & Mutters, N. (2019). Enterokokken mit speziellen Resistenzen – Epidemiologie, Hygiene und Therapie. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 144(08), 553-560. <https://doi.org/10.1055/a-0655-6454>
54. Mohamed, J. A., & Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*, 56(12), 1581-1588.
55. Mohanty, S., & Behera, B. (2022). Antibiogram Pattern and Virulence Trait Characterization of *Enterococcus* Species Clinical Isolates in Eastern India: A Recent Analysis. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 237–246. DOI: [10.1055/s-0042-1750085](https://doi.org/10.1055/s-0042-1750085)
56. Montealegre, M. C. (2016). Insights Into Determinants That Contribute To Colonization, Virulence And Antibiotic Resistance In Enterococci.
57. Monteiro Marques, J., Coelho, M., Santana, A. R., Pinto, D., & Semedo-Lemsaddek, T. (2023). Dissemination of Enterococcal genetic lineages: a one health perspective. *Antibiotics*, 12(7), 1140.
58. Monteiro Marques, J., Coelho, M., Santana, A. R., Pinto, D., & Semedo-Lemsaddek, T. (2023). Dissemination of Enterococcal Genetic Lineages: A One Health Perspective. *Antibiotics*, 12(7), 1140. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071140>
59. Motallebi, M., Seyyedi, Z. S., & Azadchehr, M. J. (2022). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of *Enterococcus faecalis* isolates obtained from stool samples of hospitalized patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 15(6).
60. Mubarak, A. G., El-Zamkan, M. A., Younis, W., Saleh, S. O., Abd-Elhafeez, H. H., & Yoseef, A. G. (2024). Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from fish, vegetables, and humans. *Scientific Reports*, 14(1), 21741.

61. Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, 399(10325), 629-655.
62. Murray, P. R., & Rosenthal, K. S. (2023). *Enterococcus*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
63. Mutuku, I. M. (t.y.). Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Patterns of Enterococcus Species Isolated from Patients Attending Aga Khan Hospital, Nairobi, Kenya.
64. O'Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and drug resistance*, 217-230.
65. Pearson, J. C., Gillett, E., Gadri, N. D., & Dionne, B. (2025). Tetracyclines, the Old and the New: a Narrative Review. *CMI Communications*, 105059.
66. Podbielska, A., Galkowska, H., & Olszewski, W. L. (2011). Review paper Staphylococcal and enterococcal virulence—a review. *Central European Journal of Immunology*, 36(1), 56-64.
67. Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Enterococci, from Harmless Bacteria to a Pathogen. *Microorganisms*, 8(8), 1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081118>
68. Reyes, K., Bardossy, A. C., & Zervos, M. (2016). Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(4), 953-965. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.07.009>
69. Rogers, R., & Rice, L. B. (2024). State-of-the-Art Review: Persistent Enterococcal Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 78(1), e1-e11. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad612>
70. Samani, R. J., Tajbakhsh, E., Momtaz, H., & Samani, M. K. (2021). Prevalence of virulence genes and antibiotic resistance pattern in Enterococcus faecalis isolated from urinary tract infection in Shahrekord, Iran. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 10(1), 50.
71. Sangiorgio, G., Calvo, M., Migliorisi, G., Campanile, F., & Stefani, S. (2024). The Impact of Enterococcus spp. in the Immunocompromised Host: A Comprehensive Review. *Pathogens*, 13(5), 409. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050409>
72. Sannathimmappa, M. B., Nambiar, V., Aravindakshan, R., & Al-Risi, E. S. (2023). Clinical profile and antibiotic susceptibility pattern of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium with an emphasis on vancomycin resistance. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 7(2), 283-287.
73. Sava, I. G., Heikens, E., & Huebner, J. (2010). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection*, 16(6), 533-540.
74. Sayiner, H. S. *Hastanemizde sürveyansla saptanan VRE'lerin dağılımı, antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi* [Doktora tezi]. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul:2008.
75. Sengupta, M., Sarkar, R., Sarkar, S., Sengupta, M., Ghosh, S., & Banerjee, P. (2023). Vancomycin and linezolid-resistant enterococcus isolates from a tertiary care center in India. *Diagnostics*, 13(5), 945.
76. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414.
77. Singh, K. V., Nallapareddy, S. R., Sillanpää, J., & Murray, B. E. (2021). Importance of the efaA gene encoding the endocarditis-specific antigen in the pathogenesis of Enterococcus faecalis. *Infection and Immunity*, 89(7), e00859-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00859-20>
78. Singh, S., & Khardori, N. M. (2012). Intra-abdominal and Pelvic Emergencies. *Medical Clinics of North America*, 96(6), 1171-1191. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2012.09.002>
79. Sood, S., Malhotra, M., Das, B. K., & Kapil, A. (2008). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian journal of medical research*, 128(2), 111-121
80. Sumangala, B., Sharlee, R., & Sahana Shetty, N. S. (2020). Identification of Enterococcus faecalis and E. faecium among enterococci isolated from clinical samples in a teaching hospital Mandya Institute of Medical Sciences, Mandya. *Indian J Microbiol Res*, 7(3), 284-287.
81. Švec, P., & Franz, C. M. (2014). The genus Enterococcus. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*, 175-211. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch15>

82. Şimşek, A. (2019). İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Tür Dağılımları Ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Afyonkarahisar.
83. Toc, D. A., Pandrea, S. L., Botan, A., Mihaila, R. M., Costache, C. A., Colosi, I. A., & Junie, L. M. (2022). Enterococcus raffinosus, Enterococcus durans and Enterococcus avium isolated from a tertiary care hospital in Romania—Retrospective study and brief review. *Biology*, 11(4), 598.
84. Upadhyaya, P. G., Ravikumar, K. L., & Umamathy, B. L. (2009). Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. *Indian journal of medical microbiology*, 27(4), 301-305.
85. Van Tyne, D., & Gilmore, M. S. (2014). Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annual review of microbiology*, 68(1), 337-356.
86. Vu, J., & Carvalho, J. (2011). Enterococcus: Review of its physiology, pathogenesis, diseases and the challenges it poses for clinical microbiology. *Frontiers in Biology*, 6(5), 357-366. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1167>
87. Werner, G., & Klare, I. (2017). Oxazolidinone resistance in enterococci and staphylococci. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(4), 362–367. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000376>
88. World Health Organization (WHO). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. WHO Press, 2021.
89. Yıldırım, D. S. (2015). Fekal ve klinik örneklerden soyutlanan enterokok kökenlerinin antibiyotik duyarlılıklarının saptanması [Yüksek lisans tezi]. Balıkesir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
90. Yıldırım, F., Şengöz, G., Yaşar, K. K., Çevik, E., Nazlıcan, Ö., Ataoğlu, E., & Elevli, M. (2007). Yenidoğanda vankomisine dirençli enterokok menenjitinin linezolid ile tedavisi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 38(1), 35-38.
91. Zhang, Junqi, et al. "The regulations of essential walRK two-component system on Enterococcus faecalis." *Journal of Clinical Medicine* 12.3 (2023): 767.
92. Zhou, W., Zhang, C., Sun, Y., Gao, S., Zhang, Y., Cao, X., Zhang, Z., Shen, H. (2020). Characterization of clinical enterococci isolates, focusing on the vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in China: Based on the data from 2013 to 2018. *BMC Infectious Diseases*, 20, 356. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05078-4>

7. ÖZGEÇMİŞ

