



FARKLI KAYNAKLARDAN *Enterococcus faecalis* VE *Enterococcus faecium*
İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANISI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Kerem DİKEN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs-2016

FARKLI KAYNAKLARDAN *Enterococcus faecalis* VE *Enterococcus faecium*
İZOLASYONU, MOLEKÜLER TANISI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Kerem DİKEN

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Tuba İÇA

Mayıs – 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kerem DİKEN'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "FAKLI KAYNAKLARDAN *Enterococcus faecalis* VE *Enterococcus faecium* İZOLASYONU, MOLEKÜLLER TANISI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğın ilgili maddeleri uyarınca değeriendirilerek kabul edilmiştir.

11 / 05 /2016

Üye : Doç. Dr. Tuba İÇA

Üye : Doç. Dr. Aynur GÜLCAN

Üye : Doç. Dr. Esra ŞEKER

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %16 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Tuba İÇA

İmzası

Kerem DİKEN

İmza

FAKLI KAYNAKLARDAN *Enterococcus faecalis* VE *Enterococcus faecium* İZOLASYONU, MOLEKÜLLER TANISI VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

Kerem DİKEN

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2016

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tuba İÇA

ÖZET

Bu çalışmada, Kütahya ilinde tavuk (35 adet), kıyma (35 adet) ve peynir (35 adet) örneklerinde *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. İzole edilen suşlar ve Evliya Çelebi Hastanesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen insan orijinli *E. faecalis* ve *E. faecium* bakterilerinin genotipik benzerlikleri araştırıldı.

Tavuk kanat örneklerinden izole edilen suşlardan %22,8'si *E. faecalis* ve %5,7'si *E. faecium*, kıyma örneklerinden izole edilen suşlardan %14,3'ü *E. faecalis* ve %20'si *E. faecium*, peynir örneklerinden izole edilen suşlardan %20'si *E. faecalis* ve %2,9'u *E. faecium* olarak tanımlandı. Gıda kaynaklı 30 Enterokok suşu (20 *E. faecalis* ve 10 *E. faecium*) ve hastaneden temin edilen insan kaynaklı 10 Enterokok suşu (5 *E. faecalis* ve 5 *E. faecium*) olmak üzere toplamda 40 Enterokok suşu genotiplendirildi.

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının genetik çeşitliliği RAPD-PCR yöntemiyle M13 primeri kullanılarak araştırıldı. Araştırılan bütün izolatlar M13 primeri ile bant oluşturdu ve sonuçlar UPGMA küme analiz programıyla değerlendirildi. *E. faecalis* suşları profillerinin küme analizleri sonucunda %70'ten fazla benzerlik gösteren 2 grup ve benzersiz 14 tip içeren 26 farklı tip gözlemlendi. *E. faecium* suşları profillerinin küme analizleri sonucunda %70'ten fazla benzerlik gösteren 5 grup ve 10 benzersiz tip içeren 15 farklı tip gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: *E. faecalis*, *E. faecium*, Genotiplendirme, RAPD-PZR, UPGMA.

**THE ISOLATION OF *Enterococcus faecalis* AND *Enterococcus faecium* FROM
DIFFERENT SOURCES AND THEIR MOLECULAR DIAGNOSIS AND
GENOTYPING**

Kerem DİKEN

Biology Major, Master's Thesis, 2016

Thesis Advisor: Associate Prof. Tuba İÇA

SUMMARY

In this study, chicken (35 pieces), ground meat (35 pieces) and cheese (35 pieces) samples in the city of Kütahya were investigated for the isolation and genotyping of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. The isolated strains and human originated *E. faecalis* and *E. faecium* bacteria provided by Evliya Çelebi Hospital, Medical School, Microbiology Major were investigated for genotyping similarities.

The isolated strains from chicken wings were identified as 22.8% *E. faecalis* and 5.7% *E. faecium*, the isolated strains from ground meat were identified as 14.3% *E. faecalis* and 20% *E. faecium* and the isolated strains from cheese were identified as 20% *E. faecalis* and 2.9% *E. faecium*. The total of 40 *Enterococcus* strains were genotyped as food sourced 30 *Enterococcus* strains (20 *E. faecalis* and 10 *E. faecium*) and hospital provided human sourced 10 *Enterococcus* strains (5 *E. faecalis* and 5 *E. faecium*).

E. faecalis and *E. faecium* strains were investigated with RAPD-PCR method by M13 primer to find out their genetic diversity. All the investigated isolates produced bands by M13 primer and the results were evaluated by UPGMA cluster analysis software. The cluster analysis results of *E. faecalis* strain profiles revealed 2 groups with more than 70% similarity and 26 different types containing 14 unique types. The cluster analysis results of *E. faecium* strain profiles revealed 5 groups with more than 70% similarity and 15 different types containing 10 unique types.

Keywords: *E. faecalis*, *E. faecium*, Genotyping, RAPD-PCR, UPGMA.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Tuba İÇA'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan eşim Yasemin DİKEN'e, öğrenim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve çalışmalarımda sık sık görüşlerine başvurduğum kuzenim Uluç Ali FİDAN'a ve teyzem Ülkü EMECAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Genel Mikrobiyolojik Özellikler	1
1.1.1. Sınıflandırılması	2
1.1.2. Görünüm ve boyanma özellikleri	3
1.2. Virülans Faktörler.....	4
1.2.1. Aderens (Konak dokulara tutunma).....	5
1.2.1.1. Agregasyon faktörü.....	5
1.2.1.2. Enterokokal yüzey proteini (Enterococcal surface protein ESP).....	6
1.2.1.3. Molekül adezyonunu tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni (MSCRAMM).....	6
1.2.1.4. <i>Enterococcus faecalis</i> antijen A proteini (EfaA Proteini).....	7
1.2.2. Salgılanan ürünler	8
1.2.2.1. Sitolizin	8
1.2.2.2. Otolizin (Autolysin)	10
1.2.2.3. Hyaluronidaz.....	11
1.2.2.4. Jelatinaz.....	11
1.2.3. Diğer virülans özellikleri	11
1.2.3.1. Lipoteikoik asit (LTA)	11
1.2.3.2. Süperoksitler	12
1.2.3.3. AS-48	12
1.2.3.4. Seks feromonlar	12
1.2.4. Biofilm formasyonu.....	13
1.2.4.1. BopD (Biofilm formation: biyofilm formasyonu)	13
1.2.4.2. Fsr (<i>E. faecalis</i> regülatörü);	13
1.2.4.3. Ebp (Endokardit-biyofilm ilişkili pilus; Endocardit-biofilm related pilus)..	14
1.2.4.4. SrtC (SortaseC) (SortazC).....	14
1.2.4.5. Sal (Secretory antigen like)	14
1.2.4.6. Epa (Enterokokkal polisakkarit antijen).....	14

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

1.2.4.7. DltA (D-alanine-D-alanil taşıyıcı protein ligaz)	15
1.3. Enterokokların Antibiyotik Dirençleri	15
1.3.1. Kromozomal direnç	15
1.3.1.1. Beta-laktam antibiyotiklere kromozomal direnç	15
1.3.1.2. Aminoglikozid antibiyotiklere kromozomal direnç	15
1.3.2. Kazanılmış direnç	16
1.3.2.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Kazanılmış Direnç	16
1.3.2.2. Yüksek düzeyde aminoglikozid antibiyotiklere kazanılmış direnç	16
1.3.3. Glikopeptid antibiyotiklere karşı direnç	17
1.3.3.1. Van A tipi direnç	17
1.3.3.2. VanB tipi direnç	18
1.3.3.3. Van C tipi direnç	18
1.3.3.4. Van D tipi direnç	18
1.3.3.5. Van E tipi direnç	18
1.3.3.6. Van G tipi direnç	19
1.4. Epidemiyoloji	19
1.5. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar	19
1.5.1. Endokardit	19
1.5.2. Bakteriyemi	20
1.5.3. Üriner sistem enfeksiyonları	20
1.5.4. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	20
1.5.5. İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar	20
1.5.6. Menenjit	21
1.5.7. Yenidoğan sepsisi	21
1.5.8. Diğer enfeksiyonlar	21
1.6. Gıdalarda Enterokok Varlığı	21
1.6.1. Süt ve süt ürünlerinde Enterokok varlığı	22
1.6.2. Et ve et ürünlerinde Enterokoklar	22
1.7. Tanı ve Tiplendirme	22
1.7.1. Fenotipik tanı ve tiplendirme metotları	23
1.7.1.1. Biyokimyasal testler	23
1.7.1.2. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	25
1.7.1.3. Multi-lokus enzim elektroforezi (MLEE)	25
1.7.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri	25
1.7.2. Serotiplendirme	25
1.7.3. Moleküler yöntemler	26
1.7.4. Genotiplendirme metotları	26

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

1.7.4.1. Restriksiyon enzim analizi (REA) bazlı yöntemler.....	26
1.7.4.2. PZR bazlı tiplendirme yöntemleri.....	26
1.7.4.3. DNA dizi analizi yöntemleri.....	28
2. MATERYAL METOD	30
2.1. Materyal.....	30
2.1.1. Örnekler	30
2.1.2. Besiyerleri.....	30
2.1.3. İdentifikasyonda kullanılan kimyasal maddeler	31
2.1.3.1. Gram boyama.....	31
2.1.3.2. Katalaz	31
2.1.3.3. %6.5'luk NaCl	31
2.1.3.4. FTS (Fizyolojik tuzlu su)	31
2.2. Metod.....	32
2.2.1. Enterokok suşlarının izolasyonu	32
2.2.2. Enterokok suşlarının identifikasyonu	32
2.2.3. PZR.....	33
2.2.4. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD-PZR)	34
3. BULGULAR.....	35
3.1. İzolasyon ve Konvansiyonel Yöntemler ile İdentifikasyon.....	35
3.2. PZR.....	35
3.3. RAPD-PZR.....	39
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR DİZİNİ	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enterokokların sınıflandırılması.....	2
1.2. Enterokokal pili ve LPXTG (Lösin-Prolin x Timin-Glisin) yüzey proteinlerinin şematik görünümü ve bilinen rolleri.	8
1.3. (a) Sitolizin pilazmiti pAD1 fiziksel haritası. (b) Sitolizin plazmidinde kodlanmış genlerin yerleşimleri.....	9
1.4. Sitozin ekspresyon modeli, ekspresyonu, olgunlaşması, salgılanması ve aktivasyonu	10
1.5. Enterekokların idendifikasyonu	24
3.1. <i>Enterococcus</i> türlerinin PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. M. DNA ladder, 1-11. İzole edilen şüpheli <i>Enterococcus</i> türlerinin PZR sonuçları.	35
3.2. <i>E. faecalis</i> ve <i>E. faecium</i> suşlarının izolat kaynaklarına göre sayısal değerleri.	37
3.3. <i>E. faecalis</i> suşlarının UPGMA analiz programına göre gruplarını gösteren dendogram.	38
3.4. <i>E. faecium</i> suşlarının UPGMA analiz programına göre gruplarını gösteren dendogram.	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enterokokların diğer Gram pozitif ve katalaz negatif koklardan ayırımı.	4
2.1. Moleküler biyolojik çalışmada kullanılan primer.	32
3.1. Peynir örnekleri ve izolatların kodları.	36
3.2. Kıyma örnekleri ve izolatların kodlar.	36
3.3. Tavuk örnekleri ve izolat kodları.	37



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

NaCl	Sodyum klorür
MgCl ₂	Magnezyum klorür

Kısaltmalar

Açıklama

AF	Agregasyon faktörü
AFLP	Amplifiye edilen fragman uzunluğu polimorfizmi
AP-PCR	Rastgele seçilmiş primerlerle yapılan PCR
BE	Safra eskülini
BHI	Beyin-kalp karışımı
BHIA	Beyin-kalp karışımı Agarı
Bp	Baz çifti
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
ÇİD	Çoklu ilaç direnci
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat karışımı
DR	Doğrusal tekrarlar
ECMP	Hücreler arası matriks proteini
EFA	<i>Enterococcus faecalis</i> A antijeni
Eh	İndirgenme yükseltgenme potansiyeli
ESP	Enterokokal yüzey proteini
FTS	Fizyolojik tuzlu su
GLU	Glukoz

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GRE	Glikopeptid dirençli Enterokok
HLAR	Yüksek eşikli aminoglikozid direnci
Hyl	Hyaluronidaz
IFN- γ	İnterferon-gama
IL	İnterlökin
IS	Dizi arasına yerleştirme elemanı
ITS-PCR	Genler arası rRNA boşluk değiştirici PCR
kb	Kilo baz çifti
LAP	Lösin-b-naftilamid
LAPace	Lösin aminopeptidaz
LTA	Lipoteyikoyik asit
MHA	Mueller hinton agarı
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
MLEE	Çok bölgeli enzim elektroforezi
MLSB	Makrolid linkomisin streptogramin B
MLTS	Çok bölgeli dizi tiplemesi
MNTL	Mannitol
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MSCRAMM	Yapışkan matriks molekül başlığını tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
NAA	Nükleik asit amplifikasyonu
Nm	Nanometre
NB	Besiyeri
OD	Optik yoğunluğu
ORF	Protein kodlayan DNA parçası
PBP5	Penisilin bağlayan protein5
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	Titreşimli alan jel elektroforezi
PI; PAI	Patojenite adacığı
PMNL	Polimorfik nükleer lökosit
PRV	Prüvat
PYR	Pirolidonil b-naftilamid
PYRase	Pirolidonilarilamidaz
QS	Bakteriler arası iletişim
RAF	Rafinoz
RAPD	Rastgele amplifikasyonlu polimorfik DNA
RE	Restriksiyon endonükleaz
REA	Restriksiyon enzim analizi
Rep-PCR	Tekrarlı PCR
RFLP	Restriksiyon parçacığı uzunluk polimorfizmi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi
SARA-PCR	Özgöl ve rastgele amplifikasyon-PCR
SRB	Sorboz

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SUK	Sükroz
TEC	Teikoplanin
TBE	Tris-borik asit EDTA tamponu
TMP-SMX; SXT	Trimetoprim-sulfometoksazol
TNF-Alfa	Tümör nekrozis faktör-alfa
TSB	Triptic soy besiyeri
VRE	Vankomisin dirençli Enterokok
VA	Vankomisin

1. GİRİŞ

Enterokoklar çevre, gıda ve klinik mikrobiyoloji açısından önemli laktik asit bakterileridirler. Bu bakteriler Avrupa da fermente gıda üretiminde yaralı oldukları gibi, probiyotik olarak ta başarıyla kullanılmışlardır. Peynir, sosis gibi fermente gıdaların üretiminde Enterokokların rol alması o bölgelere has gıdalar ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Franz vd., 2003). Günümüzde Enterokokların 40'tan fazla türü tespit edilmiştir (Murray vd., 2013). Enterokok türleri olan *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* yaygın olarak insan bağırsaklarında doğal mikroflora olarak bulunurlar ve tipik olarak hastalığa neden olmazlar. Enterokoklarla ilişkilendirilen ilk hastalık vakası 1899'da incelenen bir endokarditis enfeksiyonudur (MacCallum ve Hastings, 1899). Enterokoklar genel itibariyle yüksek patojeniteye sahip değildirler. Ancak kronik hastalığı olan yaşlı hastalarda ya da immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi sorunlara yol açabilmektedirler. En çok üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadırlar (Moellering, 1981; Krieger 1983).Yaygın olarak kullanılan son nesil vankomisin direnci kazanmış *E.faecalis* ve *E.faecium* son 30 yıldır yapılan çalışmalarda hastane enfeksiyonlarda en sık görülen Enterokok türleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Hidron vd., 2008). *E. faecalis* ve *E. faecium* ve diğer Enterokokların taşınabilir genetik elementlerle antibiyotik direnci gibi özellikler kazanabilmeleri onları en önemli nasokomiyal patojenler haline getirmiştir (Bourgogne vd., 2008; Paulsen vd., 2003).

1.1. Genel Mikrobiyolojik Özellikler

Enterokoklar fakültatif anaerofilik mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısıları 35 °C'dir. Fakat 10-45 °C'leri arasında da gelişme gösterdikleri gözlemlenmiştir. Optimal üreme pH aralıkları 7,2 civarındadır. Koyun kanlı besiyerinde 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda, 1-2 mm çapında, streptokoklardan daha kabarık, gri-beyaz renkli S tipli koloniler oluştururlar (Fisher ve Phillips, 2009). Enterokoklar oldukça zorlu ve farklı çevre koşullarına dayanıklı sporsuz bakterilerdir. Gram pozitif streptococcilerin yaşayamadığı yüksek tuz konsantrasyonlarında (6,5% NaCl) yaşayabilir ve gelişmeye devam edebilirler (Devriese vd., 2006). 5 °C gibi düşük ve 50 °C gibi yüksek sıcaklıklarda üremeye devam edebildikleri hatta 60 °C sıcaklıkta 30 dk yaşayabildikleri yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. Besiyeri bileşenlerine bağlı olarak optimum büyüme sıcaklıkları 37-42,7 °C'dir. Bununla birlikte optimum pH 7,5 değerinde büyümelerine rağmen 4,8 gibi küçük ve 9,6 gibi büyük pH değerlerinde bile yaşayabildikleri bilinmektedir (Fisher ve Phillips, 2009; Teixeira vd., 2011). Enterokokların hücre duvarının yarıya yakın kısmını peptidoglikan oluştururken geriye kalan kısımları ribitol içeren teikoik asitten ve ramnoz içeren polisakkaritten meydana gelir. Peptidoglikan kısa

peptidlerin glikan zincirlere bağlanmasıyla L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala'dan oluşur. Dizilimde yanyana kalan peptidler, pentapeptid yan zincirleri ile çapraz olarak bağlanırlar. Yapısal bileşimi tam olarak aydınlatılmamış peptidoglikan dışında başka yardımcı polimerlerde bulunmaktadır. Serolojik tiplendirmede, Enterokoklar lipoteikoik asitlerin antijenik özelliklerine göre D grubunda yer almaktadır. (Çetinkaya vd., 2000; Svec vd., 2001).

1.1.1. Sınıflandırılması

Daha önceleri sınıflandırmada streptokoklar içinde yer alan *S. faecalis* ve *S. faecium* 1984 yılında yapılan DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon deneylerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Enterococcus* olarak gruplandırılmıştır. Bu cinse aktarılan bakteriler zamanla *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus gallinorum*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium* ve *Enterococcus solitarius* gibi türlere ayrılmıştır. Enterokok cinsi içinde tanımlanan en son türler ise; *Enterococcus villorum*, *Enterococcus phoeniculicola*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus cecorum* ve *Enterococcus canis*'tir. (Koneman vd., 2005).

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

Şekil 1.1. Enterokokların sınıflandırılması (Facklam ve Teixeira, 1998).

Enterokokların identifikasyonları için çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testler kullanılır. Bakteriler öncelikle mannitol, sorbitol, sorboz sıvı besiyerlerinde asit oluşturma ve arginin hidrolizine göre değerlendirilir. Bu özelliklerine göre Enterokoklar 4 grupta incelenebilir (Facklam vd., 1999).

Grup I: *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. avium*, *E. pseudoavium* bu gruptadır. Bu türler karbonhidratlardan asit oluşturur. Fakat arginini hidrolize etmezler. Grup I'deki türler arabinoz ve rafinoz sıvı besiyerlerindeki reaksiyonlarına göre ayrılabilir. *E. avium* arabinozdan asit oluşturup rafinozu kullanmazken, *E. malodoratus* rafinozdan asit oluşturur ve arabinozu

kullanmaz. *E.raffinosis* her ikisinde de asit oluşturur. *E.pseudoavium* karbonhidratları kullanmaz.

Grup II: *E.solitarius*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E.mundtii*, *E.casseliflavus*, *E.flavescens* ve *E.gallinarum* bu grupta yer alır. Grup II'de sadece *E. faecalis* tellüriti tolere eder ve piruvatı kullanır. *E. faecium* ve *E.gallinarum* hareket testiyle birbirinden ayrılır. *E.gallinarum* hareketli, *E. faecium* hareketsizdir. *E.flavescens* ribozdan asit oluşturmaz. *E.casseliflavus* ise ribozu kullanır. *E.casseliflavus*, *E.mundtii* ve *E.flavescens* sarı pigment oluşturur. Bu grup üyeleri arginini hidrolize ederler ve mannitolden asit oluştururlar. Sorbozdan asit oluşturmazlar. Sorbitole etkileri değişkenlik gösterir.

Grup III: *E.hirae*, *E.durans*, *E. faecalis* ve *E.dispar* türlerinden oluşur. Arginini hidrolize ederler fakat mannitol, sorbitol ve sorbozdan asit oluşturmazlar. Grup III üyeleri piruvat, rafinoz, ve sukroz testleri ile kolayca ayrılabilirler. *E.durans*'ta tümü negatiftir. *E.dispar*'da tümü pozitiftir. *E.hirae* için biri veya her ikisi pozitif ve piruvat negatiftir. *E. faecalis* türleri piruvat pozitiftir, rafinoz ve sukrozdan asit oluşturmazlar.

Grup IV: *E.sulfureus* bu grupta yer alır. Arginini hidrolize etmez. Mannitol, sorbitol, sorbozdan asit oluşturmaz.

Her grup içindeki türlerde daha sonra spesifik reaksiyonlarla birbirinden ayrılır (Facklam vd., 1999).

1.1.2. Görünüm ve boyanma özellikleri

Enterokoklar Gram boyama sonucunda, Gram pozitif sonuç verirler ve 0,6-2,5 µm büyüklüğünde koklar ya da ovalimsi koklar şeklinde gözlemlenirler. Koloni görünimleri ise besiyerinin özelliklerine göre farklılık gösterebilmektedir. Sıvı besiyerinde genellikle kısa zincirler ya da çiftler oluşturmuş ovalimsi koklar olarak görülürlerken katı besiyerinde ise hücreler bazen kokobasil olarak ta görülebilirler (Teixeira vd., 2011).

Çizelge 1.1. Enterokokların diğer Gram pozitif ve katalaz negatif koklardan ayırımı (Mete, 2003).

Cins	Morfoloji	Van	Gaz	Pyr	Lap	Be	NaCl	10 °C'de üreme	45 °C'de üreme	Hareket	Hemoliz
Enterococcus	zincir	S	-	+	+	+	+	+	+	D	α , β , n
Streptococcus	zincir	S	-	-	+	-	-	-	D	-	α , β , n
Globicetella	zincir	S	-	+	-	-	+	-	-	-	α
Lactococcus	zincir	S	-	+	+	+	D	+	-	-	α , n
Vagococcus	zincir	S	-	+	+	+	+	+	-	+	α , n
Leuconostoc	zincir	R	+	-	-	D	D	+	D	-	α , n
Pedicoccus	Küme, Tetrat	R	-	-	+	+	D	-	+	-	α
Tetragenococcus	Küme, Tetrat	S	-	-	+	+	+	-	+	-	α
Aerococcus	Küme, Tetrat	S	-	+	-	D	+	-	+	-	α
Gemella	Küme, Tetrat	S	-	+	D	-	-	-	-	-	α , n
Helcococcus	Küme, Tetrat	S	-	+	-	+	+	-	-	-	n

Yukarıdaki çizelgedeki kısaltmaların anlamları: VAN: Vankomisin (30µg disk) duyarlılığı, GAZ: Mann Rogosa Sharpe (MRS) sıvı besiyerinde gaz oluşumu, PYR: L-pyrrolydonly- β -naphthylamide hidrolizi, LAP: Leucine aminopeptidase üretimi, , HEM:%5 koyun kanlı besiyerinde hemoliz, α :Alfa hemoliz, β : Beta hemoliz, n: Nonhemolitik, S: duyarlı, R: Dirençli, -> % 95 negatif reaksiyon, +> % 95 pozitif reaksiyon, D: Değişken reaksiyon.

1.2. Virülans Faktörler

Mide-bağırsak sistemde kommensal olarak bulunan Enterokoklar bazı durumlarda bağırsak dışındaki dokulara yayılarak enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Enterokokların genetik materyal transferiyle çeşitli virülans ve antibiyotik direnci gibi özellikleri kazanabilmeleri farklı dokularda olağan dışı enfeksiyonlara neden olmalarında olanak tanır. Enterokokların genetik bilgi transfer yetenekleri virülanslarını arttırmaktadır. Bununla birlikte sahip oldukları farklı virülans faktörler de dikkate alındığında Enterokok enfeksiyonlarının önemi artmaktadır (Upadhyaya vd., 2009).

1.2.1. Aderens (Konak dokulara tutunma)

Bakterilerin konak hücrelerine tutunması, mikrobiyal bir enfeksiyon sürecinin başlaması için ilk basamaktır (Baddour vd., 1990). Konakçının sindirim ürogenital ve solunum sistemlerine ait mukozal membranların yüzeylerindeki farklı yapılar patojenlerin bu dokulara yapışmasına olanak sağlamaktadır. Enterokoklar bağırsakların doğal hareketleri ve sıvılarıyla sindirim sistemi dışına çıkabilmektedirler. Bu durumlarda adhezinler vasıtasıyla lökositlere, epitel hücrelerine ve ekstraselüler matrikse gerçekleşen yapışma enfeksiyonların başlangıcının ilk aşamasını oluşturabilirler. Ayrıca adhezinlerin fagositozu başlatan efektörler gibi davrandığı ya da lokal iltihapları devam ettiren toksinlere benzer roller üstlendikleri gözlemlenmiştir (Jett vd., 1994).

1.2.1.1. Agregasyon faktörü

Bir hücre yüzey bağlayıcı proteini olan agregasyon faktörü (AF) *E. faecalis*'in feromon cevap plazmidi tarafından kodlanmıştır. Af alıcı verici bakteri hücrelerinin plazmid değişiminde rol oynayan hücrelerin etkili temasını sağlayan bakteriyel bir adhezindir. Konjugasyon sırasında bakteriyel hücrelerin temaslarını sağlamanın dışında *E. faecalis* 'in çeşitli ökaryotik hücrelere tutunmasında da rol alabilmektedir.

Agregasyon faktörü makrofajlar, böbrek epitel hücreleri, nötrofiller, bağırsak epitel hücreleri ve kalp kapaklarına tutunma sağlar. Bu da Enterokoklara endokardit ve üriner sistem enfeksiyonu yapabilme kabiliyeti kazandırmaktadır (Koch vd., 2004).

Enterokoklarda agregasyon faktörü yardımı ile gerçekleşen konjugasyonda bilinen en yüksek düzeydeki genetik madde transferinin gerçekleşmesi sağlanır ve her verici hücre genetik materyalini alıcıya aktarabilir. Enterokokların, feromon varlığına ihtiyaç duymayan konjugatif plazmidleri de mevcuttur. Bunların konjuge olma oranları daha düşük olduğu gibi, daha geniş konak bakteri yelpazesine sahiptir ve genellikle, antibiyotik dirençleri taşıyan genetik metaryeller nakledebilmektedirler.

Agregasyon faktörünün aracılık ettiği konjugasyonun, bağırsak, genital kanal, deri ve ağız boşluğu gibi *in vivo* ortamlarda da meydana gelebildiği gözlemlenmiştir (Çiftçi, 2004). Agregasyon faktörüne sahip Enterokokların daha büyük kümeler oluşturabilmesi fagositozun gerçekleşmesini zorlaştırır. Enterokok yüzey hidrofobisitesinin AF etkisi ile artması, lizozomal vezikül ile fagozomun birleşmesini güçleştirir. Agregasyon faktörü üreten *E. faecalis* suşlarının büyük bir kısmı sitolizin de üretmektedir. Bu iki özelliğe aynı anda sahip olan suşların daha virulent olma olasılığı vardır (Çiftçi, 2004).

1.2.1.2. Enterokokal yüzey proteini (Enterococal surface protein ESP)

153 kb büyüklüğüne sahip bir patojenite adasında bulunan *esp* geninde kodlanmış olan Enterokokal surface proteini konjugasyonla Enterokoklar arasında transfer edilebilmektedir. *E. faecalis* ve *E. faecium* gibi salgınlara yol açmış izolatlarda tespit edildiğinden epidemik suşların belirlenmesinde bir marker olduğu düşünülmektedir (Oancea vd., 2004; Coque vd., 2005).

Enterokokal yüzey proteini (ESP) *E. faecalis*'in abiyotik yüzeylerde ilk yapışmanın büyümesi, gelişmesini ve biyofilm formasyonunun oluşmasını sağlar. Bazı çalışmalarda, klinikte izole edilmiş suşlardaki *Esp* geninin varlığı ya da yokluğu ile biyofilm oluşumu arasında herhangi bir ilişki saptanmazken, bazılarında da *Esp* aracılı biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Biyofilm oluşumundan, *Esp*'nin yanı sıra, Enterokoklardaki başka gen bölgeleri de sorumlu tutulmuştur, hücre yüzeyinin elektriksel yükündeki heterojenitenin, *Esp* veya *GelE* gibi suşa özgül diğer niteliklerin varlığından bağımsız olarak, abiyotik yüzeylere ilk tutunmayı artırdığı iddia edilmektedir. *E. faecium*'da *Esp* sentezi değişkendir. *Esp* geni pozitif suşlardan bazıları biyofilmi neredeyse hiç yapmazken, başka suşlarda *Esp* sentezinin ve biyofilm yapımının düzeyleri yüksektir. *E. faecium*'da *Esp* sentezi, üreme koşulları ile belirlenmektedir; 37°C'de bu genin sentezi, 21°C'deki sentezine göre ve anaerop koşullarda, aerop koşullara göre daha fazladır. Enterokokların virülansını belirleyen *Esp*'nin, abiyotik yüzeylere tutunma ve biyofilm yapımında görev almasının yanı sıra, konjugasyon sıklığındaki artıştan da sorumlu olduğu bildirilmektedir (Willems ve Bonten, 2007; Van Wamel vd., 2007). N-terminal ucu vasıtasıyla hücre duvarına bağlanan ESP, bakterinin immün cevaptan canlı olarak kurtulmasını kolaylaştırmaktadır. Özellikle üriner sistem enfeksiyonlarında *E. faecalis*'in mesane epiteline yapışmasına olanak sağladığı bildirilmiştir. Bununla birlikte bakterinin bazı antibiyotiklere direnç göstermesini sağlamaktadır (Vankerckhove vd., 2004).

1.2.1.3. Molekül adezyonunu tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni (MSCRAMM)

Adhesiv matriks molekül adezyonunu tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule, MSCRAMM); *ebpAfm*, *ebpBfm*, *ebpCfm*, *scm*, *fms* genlerinde kodlandığı bilinmektedir (Sillanpää vd., 2009).

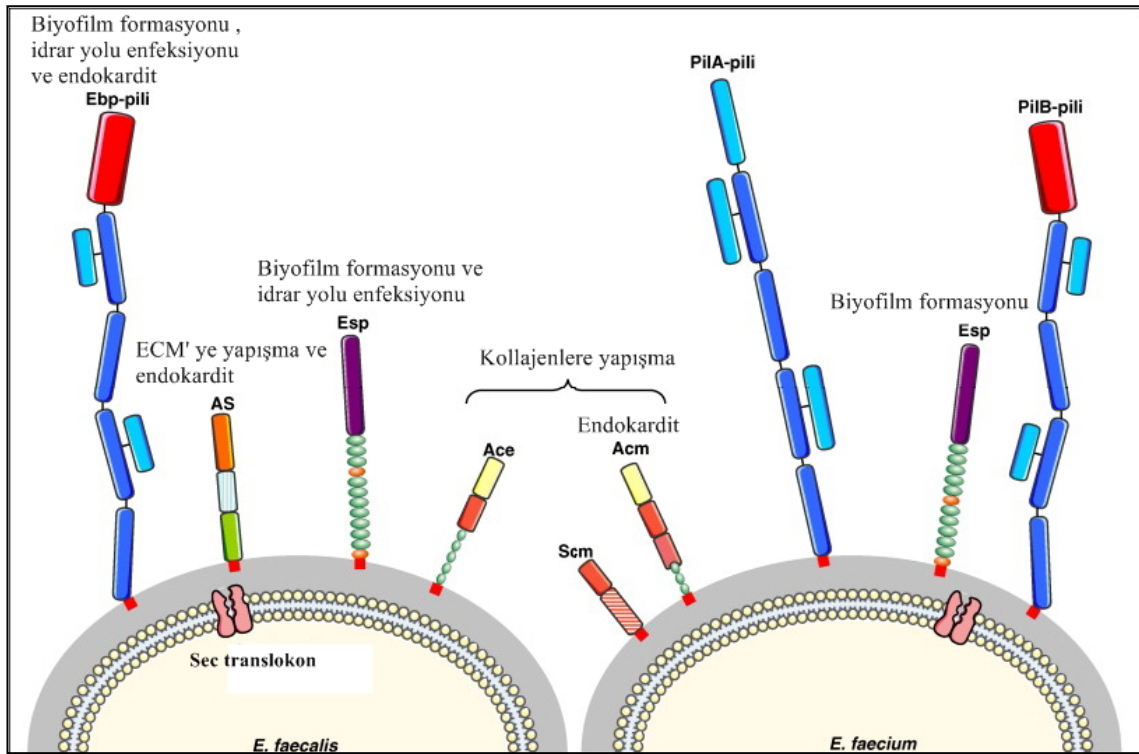
Ace (adhesin to collagen of *E. faecalis*): *Staphylococcus aureus*'un kollajen bağlayan Cna proteiniyle yapısal ve fonsiyonel benzerliğe sahip hücrenin dış yüzeyindeki matriks proteinlerine bağlanmasına olanak tanıyan protein yapıda bir adhezindir. *E. faecalis*'lerde tip I ve tip IV kollajen bağlayıcı adezin olarak tespit edilen Ace; Enterokokal enfeksiyonlarda, sıklıkla *E. faecalis*'in neden olduğu endokarditlerde izole edilmektedir.

Fekal izolatlarla oranla klinik izolatlarda bulunma oranları daha yüksektir (Sillanpää vd., 2009). Ayrıca bakterinin dentine yapışmasında etkili bir rol üstlenmektedir (Upadhyaya vd., 2009; Kayaoğlu ve Orstavik, 2004).

Acm (adhesin of collagen from *E. faecium*) ve Scm (second collagen adhesin of *E. faecium*): *E. faecium*'da tespit edilmiş kollajen bağlayıcı adezin olan Acm tip I kollajenlere tip IV'ten daha çok ilgi gösterir. Yine *E. faecium*'da tespit edilmiş kollajen bağlayıcı adezin olan Scm Tip V kollajenleri ve fibrinojenleri bağlayabilmektedir (Nallapareddy vd., 2003; Nallapareddy vd., 2006; Sillanpää vd., 2008).

1.2.1.4. *Enterococcus faecalis* antijen A proteini (EfaA Proteini)

EfaA proteini, *efaA* geninde kodlanan ilk olarak insanlarda endokardite sebep olan *E. faecalis* izolatlarında tanımlanmıştır (Lowe vd., 1995). *EfaA*'nın aminoasit dizilişi, streptokokkal adhesinler olarak isimlendirilen proteinlerle %50-60 benzerlik göstermektedir. EfaA endokarditte adhesyona neden olur. EfaA üretimi *E. faecalis* suşlarında yaygındır. Yapılan bir çalışmada incelen tüm tıbbi ve gıda kaynaklı izolatlarında *E. faecalis* *EfaA* geni tespit edilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001).



Şekil 1.2. Enterokokal pili ve LPXTG (Lösin-Prolin x Timin-Glisin) yüzey proteinlerinin şematik görünümü ve bilinen rolleri (Hendrickx vd, 2009).

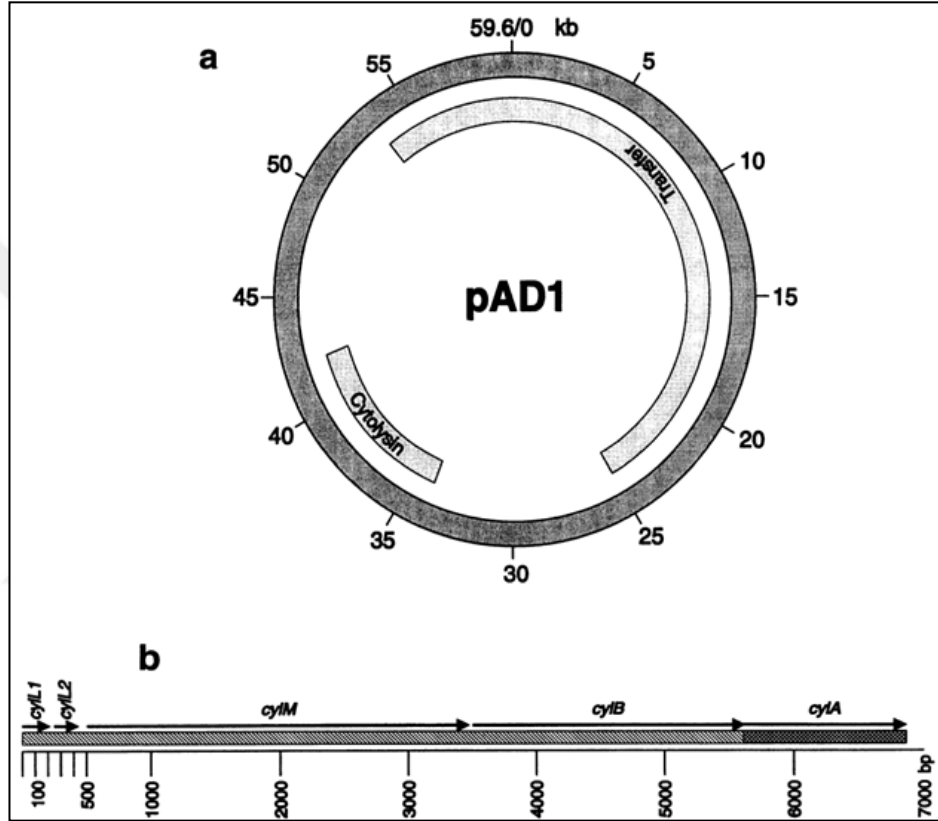
E. faecalis suşlarında EfaA, manganez transport sistemi için bağlayıcı protein reseptörüdür. EfaA'nın manganez konsantrasyonunun düşük olduğu ortamlarda fazla miktarda eksprese edildiği bilinmektedir. Enterokokların neden olduğu endokarditlerde adhezin olarak işlev gördüğü bildirilmiştir. Ayrıca süt, peynir ve et gibi klinik izolatlar dışında izole edilen *E. faecalis* suşlarında da EfaA'nın bulunduğu bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Low vd., 2003).

1.2.2. Salgılanan ürünler

1.2.2.1. Sitolizin

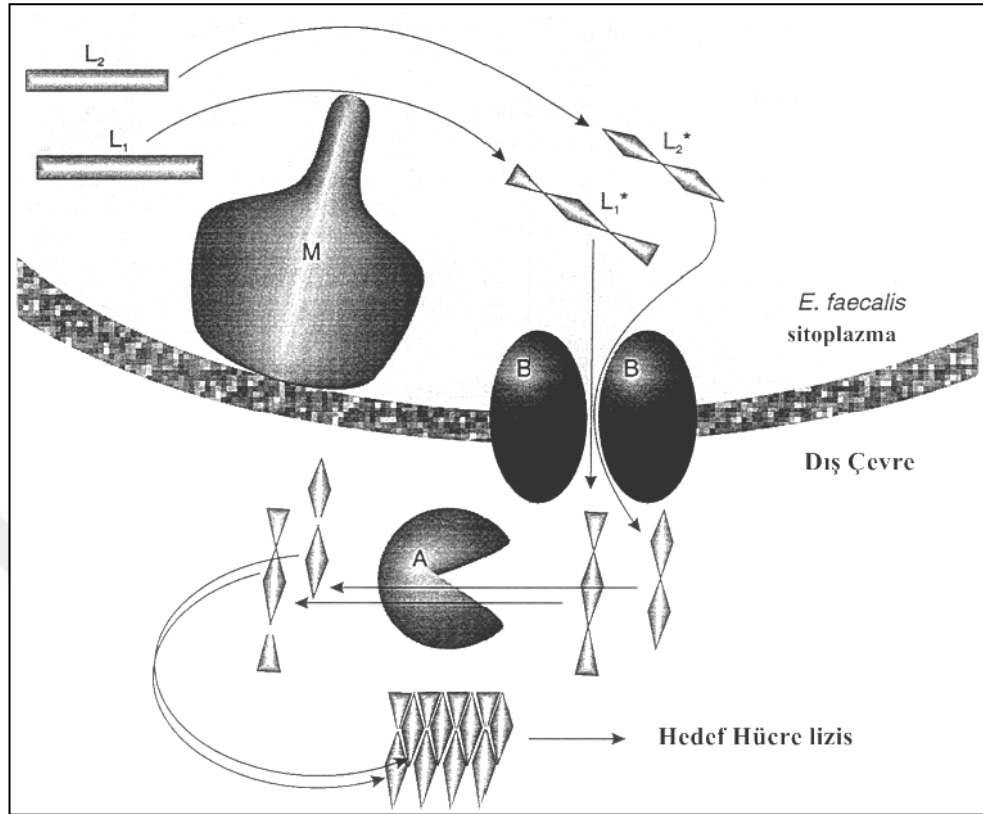
İnsan, tavşan ve at eritrositlerinde litik bir aktivite gösteren ve farklı Enterokok izolatlarında rastlanılabilen sitotoksik bir proteindir. Eritrositlerin yanı sıra makrofajlar, lökositler ve Gram pozitif mikroorganizmalara karşı litik aktivite gösterebilmektedirler. Sitolizin'in aynı zamanda bir bakteriyosin olduğu ve bakteriyosinin de bütün Gram pozitif mikroorganizmalar için bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Sitolizini kodlayan gen bölgesi bakteriyel kromozomda entegre olarak ya da plazmid üzerinde bulunabilmektedir. Sitolizin operonu *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, ve *cylI* olarak tanımlanan sekiz gen içermektedir (Cox vd., 2005; Hällgren vd., 2009; Upadhyaya vd., 2009). Sitolizin kodladığı bilinen en yaygın plazmid **pAD1** plazmididir (Clewell, 1993).



Şekil 1.3. (a) Sitolizin plazmid pAD1 fiziksel haritası. (b) Sitolizin plazmidinde kodlanmış genlerin yerleşimleri (Jett vd., 1994).

Sitolizinin altbirimleri olan CylLL ve CylLS ribozomda sentezlendikten sonra posttranslasyonel modifikasyona uğrar ardında hücre dışına taşınarak aktive olurlar. Sitolizin yapısal genlerinin transkripsiyonunu baskılayan, *cylR1* ve *cylR2* olmak üzere iki ayrı regülatör gen bulunmaktadır (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Cox vd., 2005). Sitolizin üretimi bir quorum sensing mekanizmasıyla düzenlenmektedir. CylLS sekrasyonunu düzenleyen bu mekanizma ile sitolizin ekspresyonu indüklenir (Versteeg, 1997; Devriese vd., 2006; Haas vd., 2002).



Şekil 1.4. Sitolizin ekspresyon modeli, ekspresyonu, olgunlaşması, salgılanması ve aktivasyonu (Jett vd., 1994).

Yapılan farklı bir çalışmada sitolizinin yapısal bileşenlerini kodlayan *CylLL* ve *CylLS* genlerinin regülasyonunun, ortamın oksidasyon redüksiyon (Eh) potansiyeli ile bağlantılı olduğu ve Eh potansiyelinin sitolizin üretimini arttırıcı bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Sitolizin operonu aynı zamanda *esp* ve *af* gibi diğer virülans genleri ile bağlantılıdır (Shankar vd., 2004; Kayaoglu ve Orstavik, 2004).

1.2.2.2. Otolizin (Autolysin)

Sortaz, ekstrasellüler DNA ve otolizin faktörleri *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmada etkilidir. Bu faktörlerin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Yapılmış olan çeşitli çalışmalarda *atn* geninin yoksun olduğu mutantlarda, DNA nedeniyle biyofilm oluşumunun geciktiği saptanmıştır. *E. faecalis*'te birkaç otolizin bulunarak tanımlanmıştır. *Atn* olarak bilinen N-acetylucosaminidase hücresel bölünme sırasında kardeş hücrelerin separasyonunda önemli bir yere sahiptir. Ayrıca otolizinin hücre duvarının düzenlenmesinde görev alır. Otolizin hücre duvarındaki demirleşmiş proteinlerin lokalizasyonunu gerçekleştirir.

Bu proteinlerin yerleşimleri biyofilm oluşumunun yapışma aşaması için önemlidir. *Atn* hücre büyümesinin yanı sıra hücre lizisinde de rol alır. (Guiton vd., 2009).

1.2.2.3. Hyaluronidaz

Hyaluronidaz, serin ve jelatinaz proteaz hidrolitik enzimleri içerisinde yer almaktadır. Hyaluronidaz enzimi *hyl* geninde kodlanır ve streptokokların yanı sıra stafilokoklar gibi bazı Gram pozitif bakterilerde bulunabilir. Bakteriler dışında zehirli yılanlar, kancalı kurtlar, sülük ve spermatozoa gibi memeli hücreleri tarafından da üretilmektedir. Hyaluronidaz, hyaluronik asiti tahrip ederek dokuların zarar görmesine neden olan bir enzimdir. Bağ dokudaki mukopolisakkaritlerin kısmen yapılarını bozarak hem bakteriye hyaluronik asidin parçalanmasıyla besin kaynağı sağlar hem de bakterinin yayılmasını kolaylaştırır. Hyaluronidaz kendi aktiviteleri sonucu verdiği zararın yanında diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasını kolaylaştırabilir bu da dokuda meydana gelecek hasarın şiddetini artırır. Dış çürüklerdeki doku hasarında da etkisi olan enzim Enterokokların dış kök kanallarından periapikal lezyonlara geçmesine olanak tanımaktadır (Fisher ve Fisher, 2009; Kayaoğlu ve Orstavik, 2004).

1.2.2.4. Jelatinaz

Matriks metallo proteinaz (MMP) ailesinin ekstra selüller çinko içeren bir üyesidir. Jelatin, fibrinojen, kollajen, kasein, insülin, hemoglobin ve bazı biyoaktif peptitleri hidroliz edebilen jelatinaz Enterokoklar tarafında üretilebilirler. Enterokoklarda jelatinaz enziminin varlığı 1964'te *E.faecalis* suşlarında tespit edilmiştir. *E. faecalis*'in jelatinaz üreten suşlarının üretmeyenlere oranla bölgesel toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve hayvanlarda endokardit oluşumuna büyük oranda katkıda bulundukları belirlenmiştir. Jelatinaz üretimi farklı *E. faecalis* suşlarında farklı oranlarda olmaktadır ve *fsr* lokusunda düzenlenir. Yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda izolatların %45-68'inde jelatinaz üretimini sağlayan *fsr* geni bulunmuştur. Farklı bir çalışmada ise gaita izolatlarının %53'ünde, endokardit izolatlarının ise %100'ünde *fsr* geni saptanmıştır (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Upadhyaya vd., 2009).

1.2.3. Diğer virülans özellikleri

1.2.3.1. Lipoteikoik asit (LTA)

LTA, fosfodiester ve poligliserol fosfata bağlanmış, glikolipid ihtiva eden amfipatik moleküllerdir. Hücre duvarında konumlanmış olan, Enterokokların D grubu antijenini meydana getirmektedir (Jett vd., 1994). LTA'da bulunan lipid molekülü eritrosit, trombosit, PMNL, lenfosit ve epitel hücresi gibi birçok ökaryotik hücreye bağlanabilmektedir (Kayaoğlu ve

Orstavik, 2004). LTA benzeri yüzey molekülleri, Gram pozitif bakterilerde otolitik faaliyetleri düzenlemek gibi farklı görevler üstlenebilirler (Fabretti vd., 2006). Lipoteikoik asit *E. faecalis* suşlarında verici hücrenin ürettiği agregasyon faktörü için alıcı hücrede reseptör olarak görev yapabilmektedir (Bensing ve Dunny, 1993). Bu şekilde plazmid transferini kolaylaştırarak bakterinin virülansına katkıda bulunmaktadır (Jett vd., 1994). Ayrıca antimikrobiyal peptidlere karşı direnç gelişimine ve biyofilm oluşumuna katkı sağladığı belirlenmiştir (Fabretti vd., 2006).

1.2.3.2. Süperoksitler

Güçlü oksijen radikalleri ve süperoksit anyonlar; hasarlı ve hastalıklı dokularda bozulmalara neden olmakla beraber proteinlerde, biyolojik yapılarda, lipidlerde ve nükleik asitler üzerinde de büyük yıkımlara yol açabilmektedirler. İnflamasyon yerinde doku hasarına sebep olurlar. Aynı zamanda süperoksitler plazma içerisinde nötrofiller için kemotaktik aktivite gösterirler (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004). *E. faecalis* izolatlarının çoğundan izole edilen bu süperoksitler farklı bakterilerin oluşturduğu apselerde Enterokokların diğer bakteri türlerini elemine ederek baskın hale gelmesinde rol oynar (Sağlam, 2008).

1.2.3.3. AS-48

İlk defa *E. faecalis* suşundan izole edildiği için bu isimle anılmaktadır. Birçok bakteriye karşı sitolitik aktivite gösteren plazmid de kodlanan, peptit yapılı bir bakteriyosindir. İyon geçişini indükleyebilmesinden dolayı, hedef hücrenin membran iyon yük dengesini bozmasına neden olduğu düşünülmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004).

1.2.3.4. Seks feromonlar

Seks feromonları; 7-8 amino asit uzunluğunda, *cpd*, *cob*, *ccf*, *cad* genlerinde kodlanan küçük ve hidrofobik peptitlerdir. *E. faecalis*' te sinyal peptitleri olarak işlev görmektedirler. Seks feromon sistemi ile suşlar arasında konjugatif plazmidlerin transferi birkaç kat artırılmaktadır (Clewell, 1993; Eaton ve Gasson, 2001). Kültür ortamında *E. faecalis* suşları, farklı seks feromonlar salgılamaktadırlar. Alıcı Enterokok tarafından seks feromonlarının üretilmesi verici hücrede AF üretimini başlatır. Bu durum alıcı ve verici hücreler arasında sağlam bir transfer bağı oluşturarak konjugatif plazmidin geçişini hızlandırır (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004; Eaton ve Gasson, 2001). Böylece sitolizin ve antibiyotik direnci gibi virülens faktörleri seks feromon sistemi ile *E. faecalis* suşları arasında yayılabilmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004).

1.2.4. Biofilm formasyonu

1.2.4.1. BopD (Biofilm formation: biyofilm formasyonu)

Biyofilm, biyotik ve abiyotik yüzeylerde, ekzopolimerik substanslardan oluşan sulu matrix ile kaplı bakteri popülasyonlardır. *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler. Biyofilmin meydana gelmesi oldukça karmaşık gelişim aşamalarını içermektedir. Durağan bir yüzey üzerinde öncelikle hücre-hücre etkileşimi olur ardından mikrokoloni oluşumu gözlemlenir ve en son aşamada ise biyofilm meydana gelir. Meydana gelen biyofilm yapısı üç boyutludur. Gen ekspresyonları ile bakterilerin hücre popülasyonlarının yanıtları oluşturulur. Bakteriler sahip oldukları ekstraselüler sinyal yapıları sayesinde yeterli algılama (Quorum Sensing) mekanizmalarını aktif hale getirirler. Bu mekanizma çeşitli bakterilerde biyofilm formasyonunu düzenler. Biyofilmleri ortadan kaldırmak çok zordur ve bu nedenle birçok kronik enfeksiyona sebep olmaktadır. Biyofilm oluşturmuş bakteriler fagositoza daha dayanıklı hale gelirler ve biyofilm oluşturmamış bakterilere oranla 10-1000 kat daha dirençlidirler (Mohamed and Huang, 2007). Biyofilm oluşumunu; glukoz, yeterli demir, serum, CO₂, osmolarite, sıcaklık, pH ve besin madde içeriklerine bağlıdır.

Gukoz suplementi ve TSB (tryptic soy broth) içeren besi ortamında *E. faecalis*'te biyofilm formasyonunun arttığı gözlenmiştir. Biyofilm oluşumunun şekerin varlığına bağlı olduğu durumlarda biyofilm formasyonu *bopD* geni tarafından düzenlenmektedir (Mohamed ve Huang, 2007).

E. faecalis'te osmotik değerlerin değişiklikleri biyofilm oluşumlarını etkilememektedir. İnsan serumu üzerine *E. faecalis*'in adhesin faktörünün etkisi incelendiğinde %10 'luk insan serumu takviyesi yapılan kültür ortamında *E. faecalis*'te silikon ve cam yüzeyler üzerine yapışmada artış gözlenmiştir ve serum kaynaklı biyofilm oluşumu gerçekleşmiştir (Mohamed and Huang, 2007).

1.2.4.2. Fsr (*E. faecalis* regülatörü)

E. faecalis düzenleyici geni; Biyofilm formasyonu; yeterli çoğunluğu algılama sistemi; iki bileşenli sistemi (Biofilm formation; Quorum Sensing System; Two-Component System) kodlamaktadır. *E. faecalis* 'te *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* genlerini barındıran *fsr* lokusu bulunmaktadır. *S. aureus*'ta bulunan *agrABCD* geni, *E. faecalis*'teki *fsrABC* geninin homologudur. Bu gen dizilim yeri virülens için önemlidir ve diğer genlerle birlikte çekirdek mekanizmasında düzenlediği düşünülmektedir. Serin proteinlerinin ve metalloproteinin kodlanması ve *fsrBC* gen bölgesine bağlanmasında *gelE* ve *sprE* olmak üzere iki gen görevlidir. (Bourgogne vd., 2006).

Birincil yapışmada etki sağlamasının yanında jelatinaz sentezinin aktif hale getirilmesi ve biyofilm plaklarının oluşturulmasında da rol almaktadır.(Mohamed ve Huang, 2007).

1.2.4.3. Ebp (Endokardit-biyofilm ilişkili pilus; Endocardit-biofilm related pilus)

Pleomorfik yüzey piluslarının kodlandığı gen bölgesidir. İnsanlarda endokardit sırasında antijenik özellik gösteren bu piluslar, *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmada da rol oynamaktadır (Nallapareddy vd., 2006).

1.2.4.4. SrtC (SortaseC) (SortazC)

Mekanizmaları hala tam olarak bilimeyen otolizin, sortaz ve ekstrasellüler DNA *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmada etkili faktörlerdendir. *SrtC* gen lokusu yokluğunda biyofilm oluşumu tam anlamıyla olamaz. Gram pozitif bakterilerin membranlarında, sortaz olarak bilinen demirleşmiş transpeptidaz enzimleri vardır. Biyofilm oluşumu için A sınıfı ve C sınıfı sortazlar gereklidir. *SrtC* 'nin silinmesiyle biyofilm oluşumunun azaldığı, *SrtA* 'nın silinmesiyle ise az bir etkinin olduğu gözlenmiştir (Guiton vd., 2009).

1.2.4.5. Sal (Secretory antigen like)

Enterokokların *sagA* genine benzerlik gösteren *salA* ve *salB* ile Enterokoksik lipoteiokolik asidin alanin esterleri biyofilm oluşumunda görev alırlar. Abiyotik yüzeylere ilk tutunmayı artırır (Nallapareddy vd., 2006). *salB* geni etkisiz hale getirilen *E. faecalis* mutant türlerinde biyofilm oluşumunda *salB* geni sağlam olan *E. faecalis* türlerine oranla %54 oranında azalmalar olduğu gözlenmiştir. (Mohamed ve Huang, 2007). Üç domainden oluşan *sagA* proteini ECM (ekstrasellüler matriks protein) proteinlerine geniş bir spektrumla bağlanır ve NaCl, SDS (sodyum dodesil sülfat), H₂O₂, ısı, safra tuzları, etanol, alkalın ve asit pH gibi çeşitli stres koşullarına dayanıklılık sağlar. Ayrıca bakterinin adherans ve biyofilm yeteneğini artırır. *SalA* ve *salB* genleri transkripsiyonel regülatörlerdir ve metiyonin sentezini kontrol ederler. *SalB* geninin *E. faecium*'da bulunan *sagA* genine yüksek benzerliği sadece N-terminal ucudur bu yüzden önceleri aynı isimlendirme yapılsa da sonraki çalışmalarda farklı isimlendirmeler yapılarak *salA* ve *salB* olarak adlandırılmışlardır (Mohamed vd., 2006).

1.2.4.6. Epa (Enterokokkal polisakkarit antijen)

Enterokokkal polisakkarit antijenlerini kodlayan gen olan *epa* 'nın tahrip edildiği *E. faecalis* 'in biyofilm oluşumunda %73 oranında azalmalar görülmüştür. Bu genin görevi polisakkarit sentezi içinde ve biyofilm formasyonunda glikozil transferazını kodlamaktır (Mohamed ve Huang, 2007).

1.2.4.7. DltA (D-alanine-D-alanil taşıyıcı protein ligaz)

Dlt operonunda, *dltA* geninin inaktivasyonu sonucunda D-alanin-D-alanil taşıyıcı proteini olan ligaz kodlanır ve teikoik asit üzerinde D-alanin esterleri eksikliğine yol açar ve bakteri hücre yüzeyinde önemli değişiklikler oluşur. *dltA* mutant *E. faecalis* türlerinde biyofilm oluşumu azalır (Mohamed ve Huang, 2007).

1.3. Enterokokların Antibiyotik Dirençleri

Kromozomal (İntirinsik) ya da kazanılmış (ekstrinsik) olmak üzere iki çeşit direnç mekanizmasından söz edilebilir (Başustaoğlu, 2004; Şardan, 2004).

1.3.1. Kromozomal direnç

Kromozomal direnç türlere özgü farklılıklar içerir. Enterokok türlerinin hepsinde bulunan bazı kalıtsal dirençler mevcuttur. Örneğin bütün Enterokok türleri sefalosporinlere, penisilinlere, linkozomidlere, trimetoprim-sulfometaksazollara, kinopristindalfopristin'e ve yüksek düzey hariç aminoglikozidlere karşı dirençlidirler (Korten vd., 2002; Şardan , 2004).

1.3.1.1. Beta-laktam antibiyotiklere kromozomal direnç

Beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük bağlanma eğiliminde bulunan PBP 5 enzimi sayesinde bazı Enterokok türleri sonradan kazandıkları penisilin direncine sahiptirler. Streptokoklarla karşılaştırıldığında *E. faecalis* suşlarının penisilin MİK değerleri 10-100 kat daha fazladır. (Başustaoğlu vd., 2002). Enterokokların MBK/MİK (minimal bakterisid konsantrasyonu/ minimal inhibitör konsantrasyonu) oranları 32'nin üstündedir. Bu sebeple beta-laktam antibiyotikler Enterokoklara ancak bakteriyostatik etki yapabilirler (Başustaoğlu, 2004).

1.3.1.2. Aminoglikozid antibiyotiklere kromozomal direnç

Enterokokların aminoglikozid direnci yüksek düzeyde olmamakla beraber iki tip direnç mekanizması vardır. Birincisi Enterokokların hücre duvarları aminoglikozid grubundaki antibiyotiklere karşı geçirgenliğinin az olmasıyla nedeniyle sahip oldukları dirençtir. Diğer ise sadece *E.faecium* suşlarında rastlanılmış olan bakterinin aminoglikozid yapısındaki belirli bir amino grubunun asetilasyonuna neden olan asetil CoA'ya bağımlı 6' asetiltransferaz (AAC-6') enzimi ile oluşan dirençtir. Bu enzimin aktivitesi sayesinde hücre içine geçen ilaç inaktive edilir. AAC-6' enzimi kanamisin, tobramisin, netilmisin, isepamisin ve sisomisini inaktive eder. Fakat gentamisine karşı bir etkisi olmamaktadır (Lefort vd., 2000).

Aminoglikozid grubu ilaçlar, hücre duvar sentezini engelleyen antimikrobiyal ilaçlarla beraber kullanılırsa, zarar gören ve yenilenemeyen hücre duvarı ilaçlara karşı düşük geçirgenliğini koruyamayacağından dolayı MİK değerleri büyük ölçüde düşecektir (Başustaoğlu, 2004). Enterokoklar düşükte olsa likozamid grubu antibiyotiklere kromozomal olarak dirençlidirler (Şardan , 2004; Lefort vd., 2000).

1.3.2. Kazanılmış direnç

Bu tip direncin gelişmesi genellikle bir DNA segmentinin transferi ya da bir DNA mutasyonu ile oluşur. Konjugasyon Enterokokların aktarılabilir genetik bilgiyi almalarında en önemli mekanizmadır (Korten vd., 2002).

1.3.2.1. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Kazanılmış Direnç

Enterokokların beta-laktam grubu antimikrobiyal ilaçlara karşı kalıtsal asetiltransferaz (AAC-6') enzimine bağlı direnç mekanizmasının yanı sıra sonradan kazanılabilen ve beta-laktamaz üretimi ile oluşan diğer bir direnç mekanizması da vardır. İlk beta-laktamaz üreten suş 1981 yılında ABD'de tanımlanmıştır (Derbentli, 1998; Lefort vd., 2000). 1983 yılında Murray ve arkadaşları bunu bir makalede yayınlamışlardır (Murray vd., 1983). Beta-laktamazlar çoğunlukla Enterokokların gentamisin direnç geninin de bulunduğu bir plazmid üzerinde kodlanmıştır. Beta-laktamaz enzimi ampicilin, penisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri hidrolize ederken penisiliazdan etkilenmeyen penisilinleri, imipenemi ve sefalosporinleri etkilemezler (Derbentli, 1998).

1.3.2.2. Yüksek düzeyde aminoglikozid antibiyotiklere kazanılmış direnç

Bu dirence Enterokoklarda oldukça sık rastlanılmaktadır. Kazanılmış yüksek düzeyde aminoglikozid direnci üç temel mekanizma ile meydana gelir (Lefort vd., 2000).

1. Ribozomal bağlanma alanlarında meydana gelen değişimler
2. Aminoglikozid transportunun farklılaşması
3. Aminoglikozidi modifiye eden enzimin üretilmesi

Bir şekilde ribozomal proteinde meydana gelecek bir aminoasit değişikliği bile o ribozomun antimikrobiyal ilaçlara karşı düşük afinite göstermesine neden olabilir. Ancak bu şekilde oluşan direnç çok nadir görülür ve diğer aminoglikozidlere karşı genel bir direnç oluşturmaz (Başustaoğlu vd., 2002). Nadir rastlanan bir diğer dirençte, kromozomal genlerle kontrol edilen aminoglikozid transportunun değişmesi ile oluşan dirençtir. Kazanılmış yüksek

düzeyde aminoglikozid direnci Enterokoklarda en sık aminoglikozid modifiye edici enzim üretimi ile ortaya çıkmaktadır. Bu enzimler plazmid ve transpozonlarda ki genlerde kodlanmaktadır (Lefort vd., 2000; Başustaoğlu vd., 2002). Sitoplazmada bu bölgeye geçen ilaçları inaktive edecek miktarlarda bulunurlar. Fosfotransferaz, asetiltransferaz ve adeniltransferaz olmak üzere üç tip aminoglikozid modifiye edici enzim bulunmaktadır (Başustaoğlu vd., 2002).

1.3.3. Glikopeptid antibiyotiklere karşı direnç

Glikopeptid antibiyotikler, D-ala-D-ala terminal uçlarına bağlanmak suretiyle bakteri hücre duvar sentezini bozarlar. Vankomisin dirençli Enterokoklar (VRE) ise D-ala-D-ala terminal uçlarını ligaz enzimi ile değiştirerek D-ala-D-ala-laktak ya da D-ala-D-ala-serin haline getirirler böylece vankomisin bu uçlara bağlanabilme yeteneği oldukça azalır ve hücre duvar sentezi devam edebilir. Daha eski çalışmalarda bakterilerin dirençlerinin sınıflandırılması MİK değerleri esas alınarak yapılmaktayken günümüzde bu sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığı esas alınarak yapılmaktadır (Korten vd., 2002; Korten vd., 2002). Uttley ve arkadaşları 1988'de ilk defa Enterokoklarda glikopeptidlere karşı direnci bildirmişlerdir, sonraki yıllarda tüm dünyada görülmeye başlanmıştır (Uttley vd., 1988). Türkiye'de bildirilen ilk vankomisin dirençli Enterokok (VRE) bulgusu 1998 yılında Tümer ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Daha sonra hastanelerde yapılan birçok araştırmada bulgular ve epidemiler bildirilmiştir (Öngen vd., 1999; Başustaoğlu vd., 2000). Günümüzde kullanılan direnç sınıflandırmasında glikopeptidler için altı direnç fenotipi bulunmaktadır. Bunlar; VanA, VanB, VanD, VanC, VanE ve VanG'dir.

1.3.3.1. Van A tipi direnç

En ayrıntılı olarak incelenmiş glikopeptid direnci VanA tipi dirençtir. VanA izolatlarından hem VA (MIC64 ug/ml) hem de TEC (MIC16 ug/ml) oldukça dirençli izolatlardır. Tnl546 transpozonu ve Tn5482 üzerinde kodlanan VanA gen kümesi bu direncin esas sorumlusudur. VanA gen kümesi transfer edilebilen genetik materyalde bulunabildiği gibi transfer edilemeyen genetik materyal üzerinde de bulunabilmektedir. İlk olarak *E. faecium* suşlarında tanımlanmış olsa da *E. faecalis* başta olmak üzere *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. raffinosus* ve Enterokoklar dışında bazı türlerde bulunduğu bildirilmiştir (Çetinkaya, 2000; Rice, 2001; Sayiner, 2008; Toğay ve ark., 2010).

1.3.3.2. VanB tipi direnç

Enterokoklarda VanA ligaza yapılsal benzerlikler taşıyan VanB ligaz varlığında oluşan bir dirençtir. VanB ligaz D-ala-D-ala-lac pentapeptidinin oluşumuna neden olur. Genellikle kromozomda kodlanmaktadır. Bununla birlikte Tn1547, Tn5382 transpozonlarında ve plazmidler üzerinde de bulunarak transfer edilebildiği bildirilmiştir. VanB tipi direnç gösteren Enterokok izolatlarından VA değişken düzeylerde direnç gösterirken, TEC duyarlıdır. Öncelikle *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında tanımlanmış olan VanB tipi direnç nadiren de olsa *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve Enterokoklar dışındaki türlerde de belirlenmiştir (Toğay ve ark., 2010).

1.3.3.3. Van C tipi direnç

VanC direnç fenotipinin özelliği TEC'e duyarlı, VA'e ise düşük düzeyde dirençli olmasıdır. Kromozomal bir direnç türü olan VanC tipi direnç *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* suşlarında görülür. Bu direnç fenotipi VanC-1, VanC-2 ve VanC-3 olan üç alt tipe sahiptir. Genlerin türe özel olduğu kanaati yaygındır. *E. gallinarum*'da VanC-1, *E. casseliflavus*'ta VanC-2 ve *E. flavescens*'te VanC-3 daha çok bulunmaktadır (Başustaoğlu, 2004; Sayiner, 2008; Toğay ve ark., 2010).

1.3.3.4. Van D tipi direnç

Kromozomal bir lokalizasyona sahip olan VanD *E. faecium* suşunda tanımlanmış diğer direnç tiplerine oranla yeni bir direnç tipidir. Konjugasyon mekanizması ile transfer edilemediği belirtilmektedir. Bu dirence sahip suşlar VA (MİK=64-256 ug/ml) ve TEC (MİK=4-32ug/ml) dirençlidirler. Direnç mekanizmasının VanA ve VanB tipi direnç mekanizmalarıyla benzerlik taşıdığı düşünülmektedir (Başustaoğlu; 2004; Sayiner, 2008; Toğay ve ark., 2010).

1.3.3.5. Van E tipi direnç

Van E tipi direnç önce *E. faecalis* suşunda tanımlanmış ve tipik olarak düşük VA direnci ve TEC ise duyarlıdır. Transfer edilemediği bilinen VanE geni kromozom üzerinde kodlanmaktadır. D-ala-D-ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezi ile VA direnci vardır. Genetik belirleyicisi farklı olmasına rağmen VanC tipi dirence benzemektedir ve intrinsek bir direnç tipi değildir (Başustaoğlu;2004; Sayiner, 2008; Toğay ve ark.,2010).

1.3.3.6. Van G tipi direnç

Tipik olarak düşük düzeyde VA direnci gözlenirken, TEC duyarlıdır ve ilk olarak *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Transfer edilemeyen ve nadir görülen bu direnç tipinde VanG geni sorumludur (Başustaoğlu,2004; Sayiner, 2008; Toğay ve ark.,2010).

1.4. Epidemiyoloji

Günümüzde Enterokokların dağılımları değişmekle birlikte hastanede yatan hastalar arasında sık görülen patojenler arasında üçüncü sıraya yükselmiştir. Nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık %12'sinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Kan kültürlerinden elde edilen Enterokokların %69,9'u gerçek bakteriyemi etkeni, bunların %79'u nozokomiyaldir. Enterokok enfeksiyonlarında mortalite %13.1'dir (Jones vd., 1997). *E. faecalis* türler arasında nazokomiyal enfeksiyona en sık neden olan (%85-89) mikroorganizmadır. *E. faecium* ise enfeksiyonların yaklaşık %10-15'inden sorumludur. Diğer türler daha nadir görülmektedir (<%5). Hastaların yaşamını en fazla tehdit eden türler *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur ve antibiyotik direnci özellikle bu türler arasında problem oluşturmaktadır (Fraitow H.S., ve Fraitow P., 2000). Enterokok kaynaklı enfeksiyonların yarısı yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Enterokoklar idrar yolu enfeksiyonlarının %16'sından, hastane ilişkili enfeksiyonlarının %10'undan ve bakteriyemilerin %9'undan sorumludur.

1.5. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar

Enterokok kökenli enfeksiyonlar son yıllarda dikkat çekici bir şekilde artmış ve hastane enfeksiyonlarında etmenler arasında üst sıralarda yer almaya başlamışlardır. Genel itibarıyla patojenitesi yüksek mikroorganizmalar değillerdir. Ancak özellikle yaşlı, immün sistemi baskılanmış ve ciddi kronik hastalığı olan kişilerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler. En sık üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilirler.

1.5.1. Endokardit

Enterokoklar tüm endokarditlerin %5-15'inden izole edilmişlerdir (Kreft vd., 1992). Endokarditlerden izole edilen ajanlar arasında üçüncü sıklıkta rastlanılmışlardır. Enterokokal enfeksiyonların ise % 8-30'u endokardit olarak kayıtlara geçmiştir (Livornese vd., 1992). İnsanlardan kazanılmış bakteriyemilerde 1/3 oranında iken nozokomiyal bakteriyemilerde ise bu oran %1'dir (Kreft vd., 1992). Aort kapaklarında rastlanılan endokardit ciddi cerrahi girişim gerektirmektedir. Endokardite en sık neden olan tür *E. faecalis* iken ikinci olarak *E. faecium* gelmektedir (Coudron vd., 1984).

1.5.2. Bakteriyemi

Enterokoklar bakteriyemi enfeksiyonlarına neden olan üçüncü sıklıkta rastlanılan ajanlardır. Pozitif kan kültürlerinin yaklaşık %5'inden Enterokoklar izole edilmişlerdir (Krieger 1983). En sık üriner sistem enfeksiyonuna (%19-24) neden olmaktadır. Diğer sık izole edildikler, kaynaklar ise diyabetik ayak ve dekubit ülserleri gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıdır (Kaye, 2006). Bunlara intravasküler kateter ve yanık yaraları da ilave edilebilir (Krieger 1983). Solunum sisteminde Enterokokal bakteriyemi çok nadir görülmektedir. Tek etkenin Enterokoklar olduğu bakteriyemilerde mortalite oranı %28'leri bulmaktadır. Fakat genellikle yaşlı ve hastalarda enfeksiyonlara neden oldukları için mortalitedeki rolleri tam olarak belirlenememektedir (Kreft vd., 1992).

1.5.3. Üriner sistem enfeksiyonları

Enterokokların en sık neden olduğu enfeksiyonlardır. Laboratuvarlarda idrar kültürlerinde çok sık izole edilirler. Genel olarak nozokomiyal enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. ABD'de yapılan araştırmalarda nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarında en sık rastlanan ikinci etken Enterokoklardır (Moellering, 1981; Krieger 1983). Hemolitik aktiviteye sahip Enterokok suşları diğer suşlardan daha çok böbrek enfeksiyonuna neden olmuşlardır (Gultekin, 2004). Yapılan bir araştırmada *E. faecalis*'in kataterlere yapışma oranı *E. faecium*'a kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Üriner enfeksiyonlarda bakteriyemi gelişmediği sürece mortalite oldukça düşüktür (Linden vd., 1996).

1.5.4. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Nadir görülmekle birlikte Enterokoklar selülit ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilirler (Kreft vd., 1992; Moellering, 1981). İzole edildikleri yerler genellikle cerrahi yaralar, yanık yaraları, diyabetik ayak ve dekubit ülserlerinin polimikrobiyal enfeksiyonlarıdır (Kreft vd., 1992).

1.5.5. İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokoklar intraabdominal enfeksiyonlardan ikinci sıklıkla izole edilmektedirler. Bunun nedeni ise bağırsakta bulunan diğer bakterilerle beraber polimikrobiyal floranın bir parçası olmasıdır. *E. coli* ya da *Bacteroides* spp.'e oranla daha az bakteriyemi yapmaktadırlar (Kaye, 2006). İntraabdominal enfeksiyondan kaynaklanan Enterokokal bakteriyemilerde mortalite %40 civarındadır (Taşova ve İnal 2004).

1.5.6. Menenjit

Enterokoklar nadiren sağlıklı erişkinlerde menenjite neden olurlar. Genellikle kafa travması, santral sinir sisteminde anatomik defekti olması veya noroşirurjikal girişim sonrası Enterokokal menenjit görülebilmektedir (Kaye, 2006; Livornese vd., 1992). AIDS'li immünsüpresif hastalarda veya akut lösemili hastalarda enterokokal bakteriyemiler menenjit etkeni olabilirler (Kreft vd., 1992). Altta yatan öoral tüp defekti veya hidroşefali gibi durumlarda çocuklarda da menenjite neden olabilirler (Gultekin, 2004).

1.5.7. Yenidoğan sepsisi

Uygun antibiyotik tedavisine iyi cevap veren solunum güçlüğü, letarji ve ateşle karakterize menenjit veya bakteriyemi ile ortaya çıkan bir durumdur (Kaye, 2006). *E. faecalis* veya *E. faecium*'un neden olduğı sepsis daha sık prematur veya düşük doğum ağırlıklı bebeklerde görülmektedir (Herman ve Gerding, 1991).

1.5.8. Diğer enfeksiyonlar

Diyabet hastalarında endoftalmite neden olabilirler (Kaye, 2006). Çok yaşlı ve kronik hastalığı olanlarda periodontitis ve solunum sistemi enfeksiyonları gibi oral kavite enfeksiyonlara da nadirende olsa sebep olabilirler (Gultekin, 2004).

1.6. Gıdalarda Enterokok Varlığı

Enterokokların oldukça geniş çevre koşullarına adapte olabilmeleri (düşük ve yüksek ısı, yüksek Ph ve tuz gibi) bakterinin pastörizasyon sıcaklıklarında canlı kalabilmesini ve böylece çiğ et veya süt gibi gıdalarda bulunabilmesini mümkün kılar. Bundan dolayı, bakteri fermente gıdaların özellikle peynir ve etlerin mikrobiyotasının önemli bir bölümünü oluştururlar (Foulquie vd., 2006). Türkiye'de 2009 yılında yapılan bir çalışmada peynir, yoğurt, et, hazır tüketilen gıdalar (pizza, salatalar, sütlü tatlılar vb.) ve baharatların da yer aldığı toplamda 200 adet gıda örneğinin yarısında (%50) *Enterococcus* spp. (*E. faecalis* ve *E. faecium* başta olmak üzere) kontaminasyonu bildirilmiştir.

Aynı araştırmada sadece tavuklardan izole edilen 4 izolatın vankomisin dirençli enterokok (VRA) olarak tanımlandığı ve tüm suşların *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir (Koluman vd., 2009). Enterokoklar, hayvanların bağırsak florasındaki yaygınlığa bağlı olarak özellikle hayvansal gıdalar başta, çok çeşitli gıdalarda da bulunabilirler. Bundan dolayı *E. faecalis* ve *E. faecium* bazı kaynaklara göre fekal kontaminasyon indikatörü olarak değerlendirilmektedir (Klein, 2003). Enterokokların gıdalarda sadece yetersiz hijyen indikatörü olarak değil ayrıca

gıdanın bir parçası olarak da göz önüne alınması gerektiği belirtilmektedir (Klein, 2003; İşleroğlu vd., 2008). Ayrıca bu bakteriler birçok laktik asit bakterileri gibi ısı işlem görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olma özelliğinden dolayı pastörizasyon sonrası varlığını sürdürerek, ileri seviye işlem basamaklarında (paketleme, dilimleme vb.) çapraz kontaminasyonla ürünlerde bozulmalar meydana getirerek halk sağlığını tehlikeye sokabilmektedirler (Franz ve Holzapfel, 1999; Hugas vd., 2003).

1.6.1. Süt ve süt ürünlerinde Enterokok varlığı

Enterokoklar, süt sağım takımları ile taşıma, depolama tankları, ineklerin memeleri, insan ve hayvan dışkıları, kontamine sular gibi muhtemel kaynaklardan süt ve süt ürünlerine bulaşabilirler (Franz vd., 2003; Gelsomino vd., 2001). *E. faecalis* insan dışkısında en sık rastlanılan tür iken *E. faecium*'da hayvan dışkısında en sık karşılaşılan türdür. Aynı zamanda Enterokoklar çiğ ve pastörize süttten yapılan geleneksel peynirlerin olgunlaşma ve aroma gelişiminde pozitif etkiler yaparak duysal özellikleri olumlu anlamda değiştirebilen mikroorganizmalardır (Franz vd., 2003). Starter kültür olarak kullanılsalar da geleneksel olarak üretilen birçok peynirin mikroflorasında bulunmaktadır (Beresford, 2003). Örnek olarak, inek veya koyun sütünde ya da ikisinin karışımından üretilen İtalyan Sagliano al Rubicone peynirinin olgunlaşmasında temelde laktobasiller ve Enterokokların rol aldığı ve Enterokokların son ürünün kalitesini pozitif yönde değiştirdiği bildirilmiştir (Trovatelli vd., 1987).

1.6.2. Et ve et ürünlerinde Enterokoklar

Hayvanların sindirim sisteminde bulunan Enterokokların kesim sırasında etlere bulaşma riski oldukça yüksektir. Kanatlı mezbahalarında toplanan örnekler de *E. faecalis* diğer kokal Gram pozitif bakterilere oranla çok daha fazla izole edilmiştir (Jurtura ve Lorenzelli, 1994). Enterokokların antibiyotik direnci üzerine yapılan çalışmalarda Enterokoklar dana eti, taze et ve kümes hayvanlarından sıklıkla izole edilmektedir (Franz vd., 2003). Üretim sürecinde etin ısı işlem görmesi Enterokoklar için avantaj sayılabilir çünkü enterokoklar ısıya en dayanıklı sporsuz bakteriler arasında yer almaktadır (Sanz Perez vd., 1982; Magnus vd., 1988). Enterokoklar aynı zamanda bazı fermente sosis türlerinden de izole edilmişlerdir (Teuber vd., 1996).

1.7. Tanı ve Tiplendirme

Araştırmalar da elde edilen suşların tanımlanması, benzerliklerinin ve farklılıklarının ortaya konması için, epidemiyolojik olarak tiplendirilmeleri gerekmektedir. Bu şekilde hastane

enfeksiyonları ile mücadelede gerekli olan tür ve tür içindeki suşların ilişkileri hakkında bilgi edinilebilmektedir (Köksal, 1999).

1.7.1. Fenotipik tanı ve tiplendirme yöntemleri

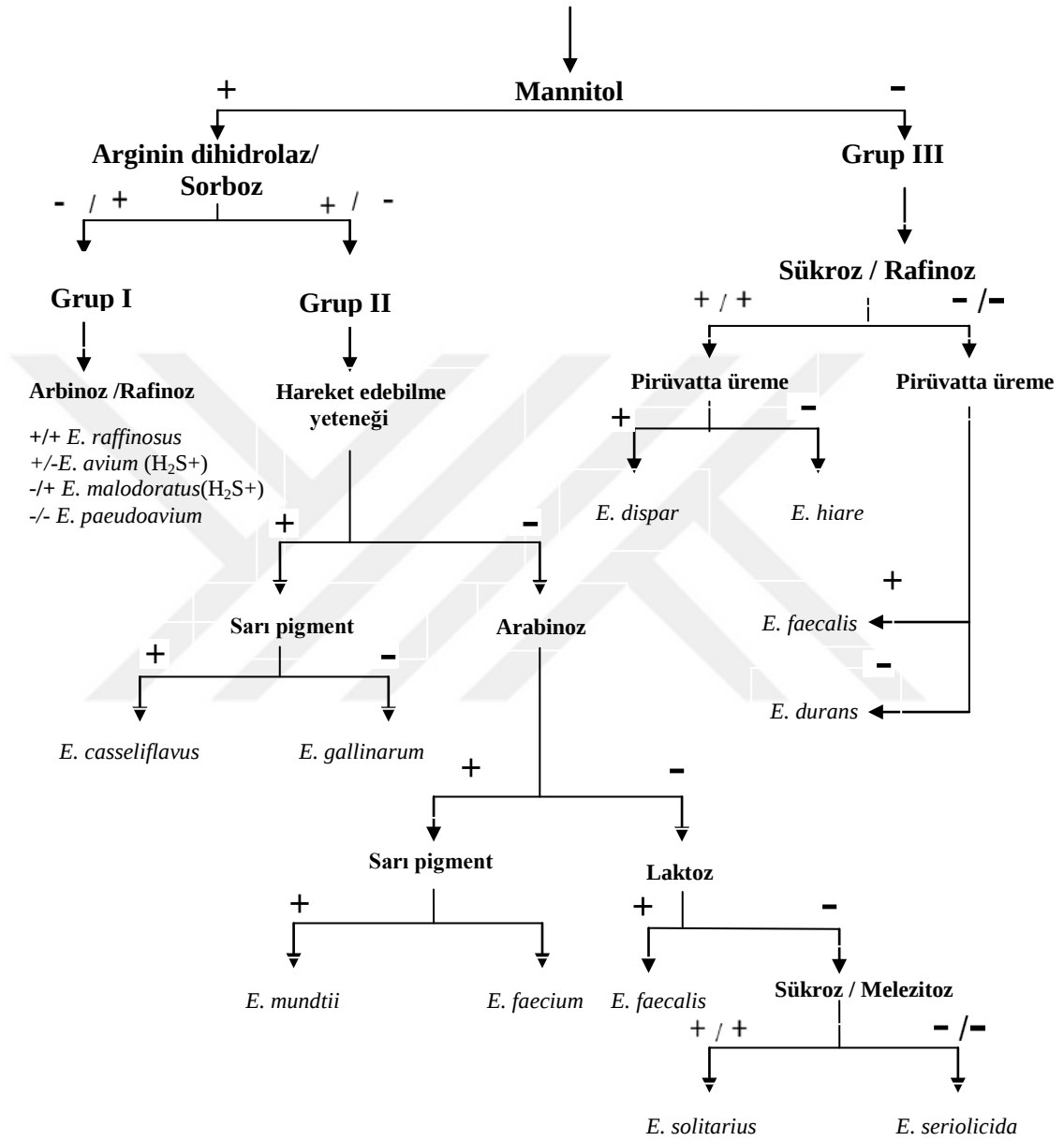
En sık kullanılan fenotipik tiplendirme yöntemleri bakterinin faj duyarlılıkları, multilokus enzim elektroforez profili, biyokimyasal özellikleri, antijenik profilleri, antibiyotik duyarlılıkları, PAGE de protein profili ve immüno-blotlama ile sitoplazmik veya hücre duvarı antijen profilinin belirlenmesi gibi yöntemlerdir (Köksal, 1999).

1.7.1.1. Biyokimyasal testler

Mikroorganizmanın fizyolojik ve metabolik karakterleri temel alınarak yapılan tiplendirmelerdir. Biyotiplendirme yöntemleri farklı enzimatik aktiviteleri, enerji metabolizması ve karbonhidrat kullanımını ölçen test yöntemlerinden yararlanılarak sonuca giden yöntemlerdir. Test sonuçları mikroorganizmanın genel morfolojik özelliklerinin yanı sıra otomatize edilmiş bir nümerik değerlendirme sistemi temel alınarak değerlendirilir.

Enterokok Türleri Ve Biyokimyasal Özellikleri

Katalaz (-) Safra eskülin (+), % 6,5 NaCl(+), PYR (+)



Şekil 1.5. Enterokokların idendifikasyonu (Koneman vd., 2006).

1.7.1.2. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Fenotipik özellikleri esas alan ayırım gücü iyi, hızlı ve tekrarlanabilirliği olan alternatif bir tiplendirme metodudur. Bütün hücre proteinlerinin ya da yalnızca hücre duvarı proteinlerinin mobil bir matrikste elektrik akımı etkisi ile moleküler ağırlığına göre göç ettirilerek ayrıştırılmaları esasına dayanmaktadır. Tür ve/veya alttür seviyesinde güvenilir sonuçlar verir. Poliakrilamid jelde elde edilen protein profillerinin bakterinin eksprese ettiği proteinler için parmak izi olarak dikkate alındığı bu yöntem, bilinmeyen izolatların tanımlanması amacı ile diğer sınıflandırma şemaları ile kombine edilerek kullanılabilir (Bilström, 2008).

1.7.1.3. Multi-lokus enzim elektroforezi (MLEE)

Ökaryotik canlıların sınıflandırılması ve populasyon genetiğinin belirlenmesinde uzun zamandır kullanımda olan standardize edilmiş bir metodudur. MLEE (Multi-lokus enzim elektroforezi)' nin sınıflandırma ve epidemiyolojik ilişkiyi tespiti yönelik diğer fenotipik yöntemlerden farkı, allel profillerinin tamamını elektroforetik tip olarak verebilmesidir. Bu yöntem hücre içi enzimlerin elektirik akımında hareket edebilme yeteneğine göre karakterize edilir ve oluşan elektromorfo tiplerine göre organizmalar birbirlerinden ayrılır (Tomayko ve Murray, 1995).

1.7.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Farklı izolatların standart bir dizi antibiyotiğe duyarlılıklarının karşılaştırılması ile elde edilen bilgilerin değerlendirilmesidir. Direnç profilleri farklılık gösteren suşlar epidemiyolojik kökenleri bakımından farklı suşlar olarak kabul edilirler. Bu yöntem çok hassas sonuçlar vermesede sayıca fazla olsa dahi bütün izolatları tiplendirebilir. Yöntemin uygulanabilirliği kolay bir testtir ve uzman bir personel gerektirmez. Özellikle Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlarda suşların tiplendirilmesi amacıyla sık kullanılırlar (Hsieh, 2000).

1.7.2. Serotipleme

Enterokokların sahip olduğu kapsüller polisakkarid antijenlerin, opsonizan antikorların hedefi oldukları bilinmektedir. Bu kapsüller polisakkarid antijen, gliserolteikoik asit benzeri bir yapı gösterir. Tavşanlardan elde edilen opsonizan antiserumlar veya formalin ile elde edilen kapsül polisakkaritlerine karşı kullanılarak subtip çalışmalar yapılır (Sharpe and Shattock, 1952).

1.7.3. Moleküler yöntemler

Enterokokların tür ve cins spesifik gen bölgelerinin amplifikasyonuna dayanarak, etkenler moleküler olarak tanımlanabilirler. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR, PCR) dur. Enterokokların tespitinde kullanılan PZR yöntemleri multipleks-PZR, nested-PZR gibi alt gruplara ayrılabilirler (Köksal., 1999).

1.7.4. Genotiplendirme metotları

Genotipik tiplendirme metodları, örnek DNA'nın spesifik restriksiyon endonükleaz enzimleri (REE) ile muamelesi sonucunda elde edilen DNA parçacıklarının elektrikli bir ortamda agaroz jel ya da akrilamid jelde elektirik akımıyla moleköl büyüklüklerine göre göç ettirilmesi ile ayrıştırılması (RFLP) ve bu ayrışan parçacıkların jelde oluşturdukları bandların ethidium bromide ile boyanmasıyla yada işaretli proplar kullanılarak görüntülenmesi ile yapılmaktadır. Hedef DNA, PZR ile amplifiye edilmeden önce ya da edildikten sonra restriksiyon endonükleazlarla (RE) kesilerek analiz edilebilir. Genotipik tiplendirme metodlarında hedef, plazmide veya mitokondriaya ait DNA olabileceği gibi kromozomal DNA ve kromozom üzerindeki belirli gen bölgeleri de olabilir (Köksal,1999). Bakteri DNA'sı içerisindeki baz tekrar bölgelerinin amplifikasyonuna dayalı tiplendirme metodları da genotiplendirme amacı ile kullanılabilir (Rep-PCR gibi). Bu yöntemler aşağıda kısaca özetlenmektedir.

1.7.4.1. Restriksiyon enzim analizi (REA) bazlı yöntemler

Enterokoklardan elde edilen DNA'nın uygun restriksiyon ezimlerinden bir veya birkaçı ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan DNA fragmanlarının agaroz jel elektroforeziyle bant büyüklüğüne göre ayrıştırılır ve analiz edilir. Enzim uygulanacak bölge Enterokok plazmitleri olabileceği gibi koromozm da olabilir (plazmid DNA profil analizi, pulse field gel elektroforez) (Köksal, 1999, Durmaz ve Durmaz, 2001, Zaidi ve Konstantinou, 2003,).

1.7.4.2. PZR bazlı tiplendirme yöntemleri

Mikroorganizmaların belirlenen DNA bölgelerinin amplifikasyonuna dayalı bir yöntemdir. PZR bazlı tiplendirme yöntemler hızlı sonuç verdikleri için kısa sürede gelişen salgınların etmenlerini belirleyebilmek için başarıyla kullanılmaktadır.

- a) Restriction fragment length polymorphism (RFLP)PCR-RFLP
- b) Repetitive Extragenic Palindromic Element (REP)- PCR
- c) RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri

- d) Arbitrarily Primed (AP)-PCR ve Dna Amplification Fingerpringing (DAF)
- e) Amplified Fragment Lenght Polymorphism (AFLP)

Başlıca kullanılan PZR bazlı yöntemlerdir (Soll vd., 2003; Rademaker ve Savelkoul, 2004).

a) Restriction fragment length polymorphism (RFLP): Mikroorganizmaların yoğun kültürlerinden elde edilen ya da moleküler yöntemler kullanılarak çoğaltılan kromozomal DNA'nın uygun RE ile kesilmesi ve oluşan DNA fragmentlerinin agaroz elektroforeziyle ayrıştırılması sağlanır. Artı yönleri; kolay, hızlı ucuz ve tekrarlanabilirliği yüksek olmasıdır. Eksi yanları ise RE'nin DNA yı çok kesmesiyle çok sayıda oluşan DNA parçacıklarının fazla band oluşturması değerlendirme aşamasında sorun oluşturmaktadır. Bu yöntem oluşan bandların belirli bir kısmı ile hibridizasyona girebilecek problemler vasıtasıyla bu sorunu aşmaktadır. Agarozdaki DNA parçalarının denatüre edilmesi, naylon bir membrana aktarılması ve işaretli problemlerle hibridizasyonunun yapılması ile gerçekleşir (Zaidi ve Konstantinou, 2003; Yağcı, 2001).

b) Tekrarlayan DNA dizilerine dayalı PZR (rep-PZR) tiplmesi: Temel olarak bakterilerin genomları boyunca tekrarlayan DNA dizilerine komplementer primerler kullanılarak tekrarlar arasında kalan DNA dizilerinin amplifikasyonu yapılır. Suşlar arasında tekrarlayan bölgelerin sayısı ve yerleri tipleme için tipe özgü yeterli band profilini oluşturmaktadır. Tekrarlayan dizilimler; REP dizilimler, ERIC dizilimler ve S. pneumoniae'nin BOX elementi olmak üzere üç grupta incelenmektedir (Rademaker ve Savelkoul, 2004).

c) RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri: RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk defa 1990' da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu' nu (PCR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams vd., 1990). RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Williams vd., 1990; Welsh ve McClelland., 1990). Tekniğin aşamaları şu şekilde özetlenebilir:

1. PCR işleminde kullanılacak primerlerin, nükleotid dizileri belli bir kriter olmaksızın rastgele seçilir ve sentezi yapılır,

2. Seçilen bu primerler kullanılarak araştırılan genomik DNA' da PCR uygulaması başlatılır. Primerler PCR işlemi esnasında genomik DNA'da simetriği olan bölgelere yapışır ve bu bölgeler geometrik olarak çoğalır,

3. Bu şekilde çoğaltılan DNA parçaları, elektroforez işlemiyle agaroz jelde yürütülür,

4. Etidyum bromid ya da radyoaktif maddelerle boyanarak molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve bantlaşma gösteren parçacıkları değerlendirerek DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenir (Devrim ve Kaya, 2006).

d) AP-PZR ve DAF tipleme yöntemleri: Bu yöntemde hedefe bağlı kalınmadan rastgele seçilmiş kısa primerler kullanılarak, jel elektroforezinde değişik bant profilleri oluşturabilen farklı uzunluklarda DNA amplifikasyon ürünleri elde edilmektedir. Kolay uygulanabilmesi, hızlı sonuç vermesi ve nispeten ucuz olması nedeniyle tercih edilen ancak henüz belirli bir standarta oturtulamamış bir yöntemdir (Rademaker ve Savelkoul, 2004).

e) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): Bu yöntemde kromozomal DNA'nın genellikle iki RE ile kesilmeyle oluşan DNA parçalarının selektif amplifikasyonuna dayanır. Farklı enzimler kullanılabilmesine rağmen genelde tercih edilen EcoRI-MseI enzim kombinasyonudur. DNA saflık derecesi ve konsantrasyonu testin başarılı sonuç verebilmesi için önemli iki ana faktördür. Bu test yüksek bir ayırım gücüne sahiptir. Pahalı olan DNA dizilim cihazına gerek duyulması ve zor temin edilebilen radyoaktif madde veya floresans veren maddelerin kullanılması yöntemin eksileri olarak düşünülmektedir.

1.7.4.3. DNA dizi analizi yöntemleri

Diğer birçok mikroorganizmada özellikle tek nokta mutasyonlarına dayalı bilinen veya bilinmeyen farklılıkları tespiti yönelik olarak kullanılan ve epidemiyolojik metodlar içerisinde en yüksek ayırım gücüne sahip olan dizi analizi yöntemi Enterokok izolatlarının cins ve tür ayırımının yanı sıra izolatların klonal ilişkilerinin tespitinde de kullanılmıştır.

Parsiyel dizi analizi: 16S rDNA V4 ve V9 bölgelerine yönelik PZR analizini takiben yapılan parsiyel dizi analizi, Enterokokların identifikasyonu ve sınıflamasında güvenilir bir tekniktir. VRE' lerin identifikasyonunda da multipleks PZR ile kombine olarak bu yöntem kullanılmıştır (Bilström, 2008).

Multilocus sequence typing (MLST): Geleneksel multilokus enzim elektroforezinin genom temelli versiyonudur. 1998 yılında tanımlanan yöntemde; nükleotid dizi analizi ile birkaç temel metabolik fonksiyonu kodlayan genin (housekeeping gene) allelleri

araştırılmaktadır. Yöntem; genellikle yedi tane housekeeping genin (lokusun) arasında kalan gen parçalarının (internal fragments) PCR ile çoğaltılması ve dizi analizlerinin çıkarılması aşamalarından oluşmaktadır. Allel profili veya suşa özgü karakteri oluşturmak için, her bir lokus için, her farklı dizilim, farklı bir allel numarasıyla gösterilir. Böylece yedi lokustaki allel numaraları oluşturulur. Her bir özgü allel kombinasyonu suşun dizi tipini belirler. Birbirleriyle ilişkisiz iki suşun aynı allellik profili oluşturma olasılığı oldukça düşüktür.



2. MATERYAL METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Örnekler

Çalışmada, Kütahya ilinde, Ekim 2014 - Eylül 2015 tarihleri arasında farklı perakende satış noktalarından toplanan 35 adet kıyma, 35 adet tavuk kanadı ve 35 adet peynir örneği ile çalışıldı. İnsan Enterokok suşları Evliya Çelebi Hastanesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edildi.

2.1.2. Besiyerleri

Enterokokkal selektif besiyeri (BBL Enterococcosel Agar, USA)

Enterokokkal selektif besiyeri, Enterokokları ve *Streptococcus bovis* grubunu diğer Streptokoklardan ayırtmak için kullanılır (Facklam vd., 1999; Ruoff vd., 1999). Enterokoklar eskülünü hidrolize eder ve siyah renk oluşur. Besi yerinin hazırlanması amacı ile Enterokokkal selektif hazır toz besiyerinden 57,25 gr alınıp 1000 ml distile su içerisinde eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Soğutulduktan sonra 9 cm çaplı petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

Brain heart infusion agar (BHIA)

Selektif besiyerinde üreme gösteren kolonileri pasajlamak için Brain heart infusion broth (BHIB; Beyin kalp infüzyon broth) kullanıldı. Bu amaçla Oxoid marka BHI broth toz besiyerinden 37 gr alınarak 1000 ml distile su içinde eritildi. İlave olarak 15 gram agar-agar besiyeri (Merck) ilave edildi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Soğutulduktan sonra 9 cm çaplı petrilere 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü.

%15-20'lik gliserinli Brain heart infusion broth (BHI)

BHI hazır toz besiyerinden 3,7 gr alınarak 80 ml distile su içerisinde eritildi. Karışımın tamamen homojenitesi sağlandıktan sonra bu karışım içerisine 20 ml gliserin ilave edildi. Gliserin zor karışan bir kimyasal olduğundan tamamen homojenlik sağlanana kadar karıştırılmaya devam edildi. 2 ml' lik ependroflara 1 ml olacak şekilde otomatik pipet yardımıyla aktarıldı ve hazırlanan besiyeri 121°C de 15 dakika otoklavlandı. Bu besiyerleri suşları saklamak amacıyla kullanıldılar ve -20°C de saklandılar.

2.1.3. İdentifikasyonda kullanılan kimyasal maddeler

2.1.3.1. Gram boyama

Özel gram iyotu, aseton, etil alkol, jansiana moru (kristal viole) bazik fuksin kullanıldı.

Jansiana moru stok solüsyonu: Bir havana 5 gr kristal viole konularak üstüne %95' lik etil alkol ilave edildi ve erimesi sağlandı. Hazırlanan karışım manyetik karıştırıcı ile 4-5 saat çalkalandıktan sonra 24 saat oda ısısında bekletilerek filtre kağıdıyla süzüldü. Hazırlanan boya kullanılmak üzere koyu renkli cam kapaklı şişelere aktarıldı.

Özel gram iyotu stok solüsyonu: Havana 4 gr Potasyum iyodür konuldu, ezilip üzerine yavaş yavaş 600 cc su ilave edilerek karıştırıldı. Filtre kağıdından süzülerek hazırlanan boya kullanılmak üzere koyu renkli cam kapaklı şişelere aktarıldı.

Aseton-etil alkol: Gram boyamada renk giderme aşamasında kullanılmak üzere 1:1 oranında aseton-etil alkol karışımı hazırlandı.

Bazik fuksin stok solüsyonu: Bazik fuksin (3 gr) bir havana konuldu ve üzerine yavaş yavaş 100cc alkol ilave edildi. Boyanın ezilerek erimesi sağlandı. Hazırlanan karışım bir erlene konularak manyetik karıştırıcıda 4-5 saat çalkalandı. Boya solüsyonu 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra filtre kağıdından süzüldü. Gram boyamada kullanılmak üzere cam kapaklı kahverengi şişelere aktarıldı.

2.1.3.2. Katalaz

Katalaz testinde kullanılmak üzere %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solusyonu hazırlandı.

2.1.3.3. %6.5'luk NaCl

Şüpheli kolonilerin %6,5 tuz (NaCl) bulunan besiyeri ortamında üreme özelliklerini tespit etmek amacıyla kullanıldı. BHI sıvı besiyeri 100ml'si içerisinde 6,5 gr tuz olacak şekilde hazırlandı. Deney tüplerine 4 ml dağıtıldı, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

2.1.3.4. FTS (Fizyolojik tuzlu su)

Tavuk etleri üzerinden yıkantı sıvısı elde etmek amacı ile %0,9 FTS solüsyonu kullanıldı. 1000 ml distile su içerisine 9 gr NaCl ilave edilerek, karıştırıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

PZR’de kullanılan kimyasallar:

Primer tablosu: Bu çalışmada tür teşhisi amacı ile PZR’de kullanılan primerlere ait baz dizisi ve RAPD ‘de kullanılan M13 primerine ait baz dizisi çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Moleküler biyolojik çalışmada kullanılan primer (Jackson vd., 2004).

Primerler	Oligonükleotid dizisi (5’-3’)
FL1 (<i>E. faecalis</i>)	5’- ACTTATGTGACTAACTTAACC -3’
FL2 (<i>E. faecalis</i>)	5’- TAATGGTGAATCTTGGTTTGG -3’
FM1 (<i>E. faecium</i>)	5’- GAAAAACAATAGAAGAATTAT -3’
FM2 (<i>E. faecium</i>)	5’- TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA -3’
M13	5’-GAG GGT GGC GGT TCT-3’

2.2. Metod

2.2.1. Enterokok suşlarının izolasyonu

Enterokok izolasyonu amacı ile steril şartlar altında her bir örnekten 10’ar gr (tavuk kanat derisi, kıyma ve peynir) tartıldı. Tartım işlemi sonucunda numuneler steril plastik poşetlere konularak üzerine 90 ml steril distile su ilave edildi. Örnekler homojenizator (stomacher) içerisinde yaklaşık 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler Enterokokal selektif agara ekildi. Enterokokal selektif besiyerinde siyah koloni meydana getiren Enterokok şüpheli etkenler BHIA besiyerinde saflaştırılıp çoğaltılarak %15-20 gliserin içeren BHI broth besiyerine ekildi ve -20°C de saklandı.

2.2.2. Enterokok suşlarının identifikasyonu

Kültür ve bakteriyoskopi: BHIA’da çoğaltılan şüpheli bakteriler Gram boyanma özellikleri ve morfolojilerine göre bakteriyoskopik olarak değerlendirildi. Gram boyama amacı ile şüpheli bakteriden preparat hazırlandı. Fiziksel fikzasyon sonrasında kristal viole ile muamele edildi ve yıkandı. Gram iyodu ile muamele edildi ve yıkandı. Aseton-alkol ile yaklaşık 20 saniye veya renk giderimi gerçekleşinceye kadar dekolorizasyon işlemi yapıldı ve yıkandı. Preparat 30-60 saniye bazik fuksin ile muamele edildi. Su ile yıkanarak kurutma kağıdı ile

kurutuldu. 100'lük objektifte immersiyon yağı damlatılarak görüntüldü. Mor kok etkenler Enterokok şüpheli olarak değerlendirildi.

Katalaz testi: Enterokok şüpheli kolonilerden öze yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerine konuldu. Üzerine %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit)' den birkaç damla damlatıldı. Hava kabarcığı oluşturmeyen örnekler katalaz negatif olarak değerlendirildi (Aydın, 2004).

%6,5'lük NaCl üreme testi: Şüpheli koloniden öze ile %6,5 NaCl içeren BHI buyyonu içerisine ekim yapılarak 35°C de 24-72 saat inkübe edildi. Buyyonda üreme sonucu bulanıklık oluşturan suşlar pozitif olarak değerlendirildi (Aydın, 2004).

2.2.3. PZR

Gram pozitif kok, katalaz testi negatif ve %6,5'lik NaCl' li buyyonda üreme sonucunda *Enterococcus* şüpheli olarak değerlendirilen suşlar moleküler analize tabi tutuldu. Bu amaçla sırası ile DNA ekstraksiyonu, mPCR ve agaroz jel elektroforez ile görüntüleme işlemleri yapıldı.

DNA ekstraksiyonu: İçerisinde 300 µl saf su bulunan 2 ml' lik steril ependroflar hazırlandı ve içerisine bir öze dolusu bakteri süspansiyonu yapıldı. Ağızları sıkı bir şekilde kapatılan ependroflar kaynamakta olan su içerisinde 20 dk bekletildi. Bu işlemten sonra 5 dakika 5000 devirde santrifüj edildi ve 200 µl süpernatant alınıp yeni ependorflara aktarıldı. Bu örnekler PZR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

PZR: İzole edilen tüm suşların identifikasyonları PZR kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada ekstraksiyonu yapılmış 5 µl kalıp Enterococcal DNA olmak üzere toplamda içerisinde; 1x PCR buffer, 3 mM $MgCl_2$, her biri 200 µM olan dNTP, her biri 1 mM olan primer ve 2 U Taq DNA polimeraz olan 25 µl PCR karışımı kullanıldı. Termal şartlar ise 95 °C' de 4 dakika başlangıç denaturasyonu, 35 siklustan oluşan 95 °C' de 30 sn denatürasyon, 55 °C' de 1 dakika birleşme (annealing), 72 °C' de sentez ve çoğalma (extention) ve 72 °C' de son ekstensiyon şeklinde uygulandı.

Agaroz jel Elektroforez: Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan ürünlerin varlığını gösterebilmek amacı ile amplikonlar agaroz jel içerisinde elektroforez işlemine tabii tutuldu. Bu amaçla 1x TBE solüsyonu ile %1,5' lik agaroz jel hazırlandı. Jel içerisine %0,5 ethidium bromid ilave edildi. Amplikonlar parafilm üzerinde 6 x jel loading buffer ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi. 1. kuyuya DNA markeri (Fermentas O'Range Ruler, 100bp Ladder, Lot: 0302) ve diğer kuyulara, her birine bir örnek olacak şekilde bu karışımdan 10 µl

yükleme yapıldı. Tankın güç kaynağı çalıştırılarak 120 V akım verildi. Brom fenol mavisinin jeldeki migrasyonu takip edilerek, boya jelin 2/3' lük kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.

2.2.4. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD-PZR)

RAPD-PCR analizinde M13 primeri kullanıldı. DNA, M13 primeri ile 35 siklusa (94 °C de 1 dakika; 40 °C de 1 dakika, 72 °C ye ulaşana kadar 3 dakika; 72 °C de 10 dakika) çoğaltıldı. Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan ürünlerin varlığını gösterebilmek için amplikonlar %0,5 ethidium bromid ilave edilmiş, %1,5' luk agaroz jelde koşturuldu. RAPD-PCR sonuçları, UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic gruplandırma) programıyla değerlendirildi. Suşların gruplama benzerlik oranları %70 olarak alındı (Versalovic vd., 2002). RAPD-PCR'ın ayırım endeksleri daha önceki çalışmalarda belirlenmiş formülle hesaplandı (Hunter ve Gaston, 1988). Referans aralıkları da (the confidence intervals) daha önce çalışmalarda kullanılmış formülle hesaplandı (Grundmann vd., 2001).

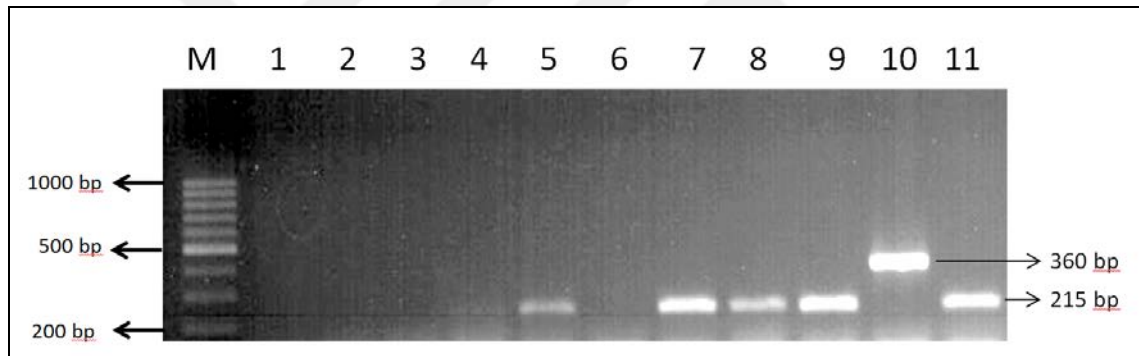
3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve Konvansiyonel Yöntemler ile İdentifikasyon

Çalışmada, Kütahya ilinde, Ekim 2014 - Eylül 2015 tarihleri arasında farklı perakende satış noktalarından toplanan 35 adet kıyma, 35 adet tavuk ve 35 adet peynir örneği değerlendirildi. İncelenen örneklerin laboratuvar analizleri sonucunda, Enterokokkal selektif besiyerinde üreme gösteren, Gram pozitif kok şeklinde görülen, katalaz negatif, %6,5 NaCl içerikli besiyerinde gelişebilen 30 adet şüpheli Enterokok suşu izole edildi.

3.2. PZR

Konvansiyonel yollarla identifikasyonu yapılan 30 adet şüpheli Enterokok suşu ve hastane kaynaklı 10 adet Enterokok suşu, tür tespiti amacı ile PZR işlemine tabii tutuldu.



Şekil 3.1. *Enterococcus* türlerinin PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. M. DNA ladder, 1-11. İzole edilen şüpheli *Enterococcus* türlerinin PZR sonuçları.

Bu işlem sonunda gıda kaynaklı şüpheli suşlarda 20'si *E. faecalis* ve 10'u *E. faecium* olarak saptandı. İdentifikasyon sonrasında çalışılan örneklerdeki Enterokok dağılımları şu şekildedir;

- Tavuk kanat derisi; 8 (%22,8) adet *E. faecalis*, 2 (%5,7) adet *E. faecium* izole edildi.
- Kıymadan; 5 (%14,3) adet *E. faecalis*, 7 (%20) adet *E. faecium* izole edildi.
- Peynir örneklerinden; 7 adet (%20) *E. faecalis*, 1 adet (%2,9) *E. faecium* izole edildi.

Çizelge 3.1. Peynir örnekleri ve izolatların kodları.

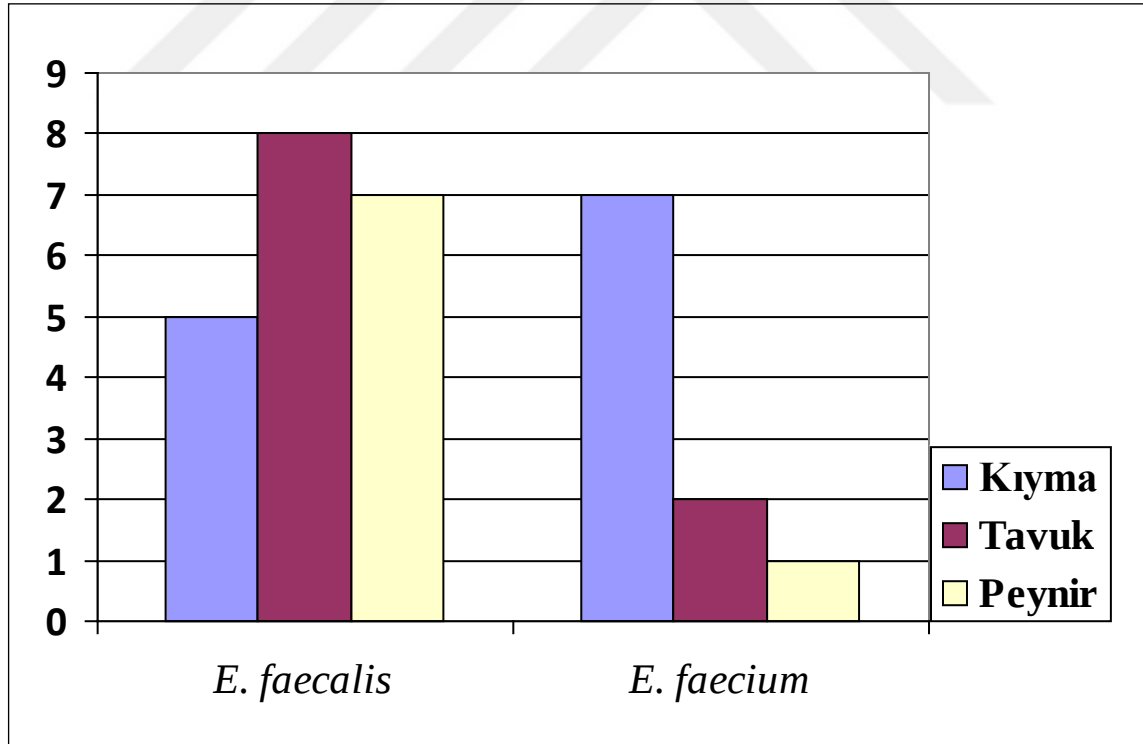
Adet	İzolatların Kodları	İzole Edildiği Yer	Katalaz	%6.5 NaCl	Gram Boyama	PZR sonucu
1	E 15	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
2	E 16	Peynir	-	+	+	<i>E. faecium</i>
3	E18	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
4	E 24	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
5	E 26	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
6	E 27	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
7	E 43	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
8	E 46	Peynir	-	+	+	<i>E. faecalis</i>

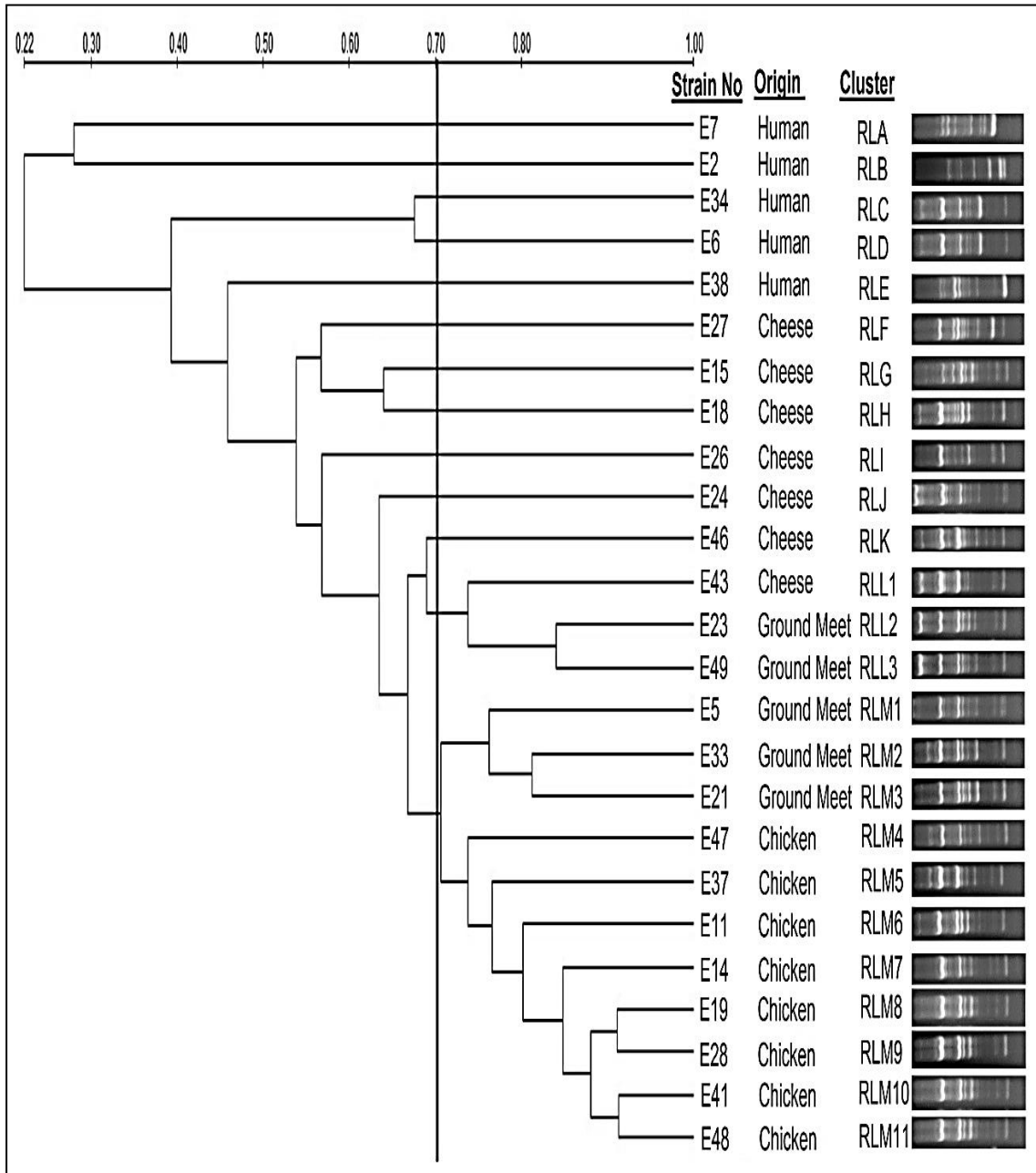
Çizelge 3.2. Kıyma örnekleri ve izolatların kodlar.

Adet	İzolatların Kodları	İzole Edildiği Yer	Katalaz	%6.5 NaCl	Gram Boyama	PZR sonucu
1	E 5	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
2	E 21	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
3	E 23	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
4	E 33	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
5	E 49	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
6	E 10	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>
7	E 17	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>
8	E 22	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>
9	E 25	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>
10	E 32	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>
11	E 36	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>
12	E 42	Kıyma	-	+	+	<i>E. faecium</i>

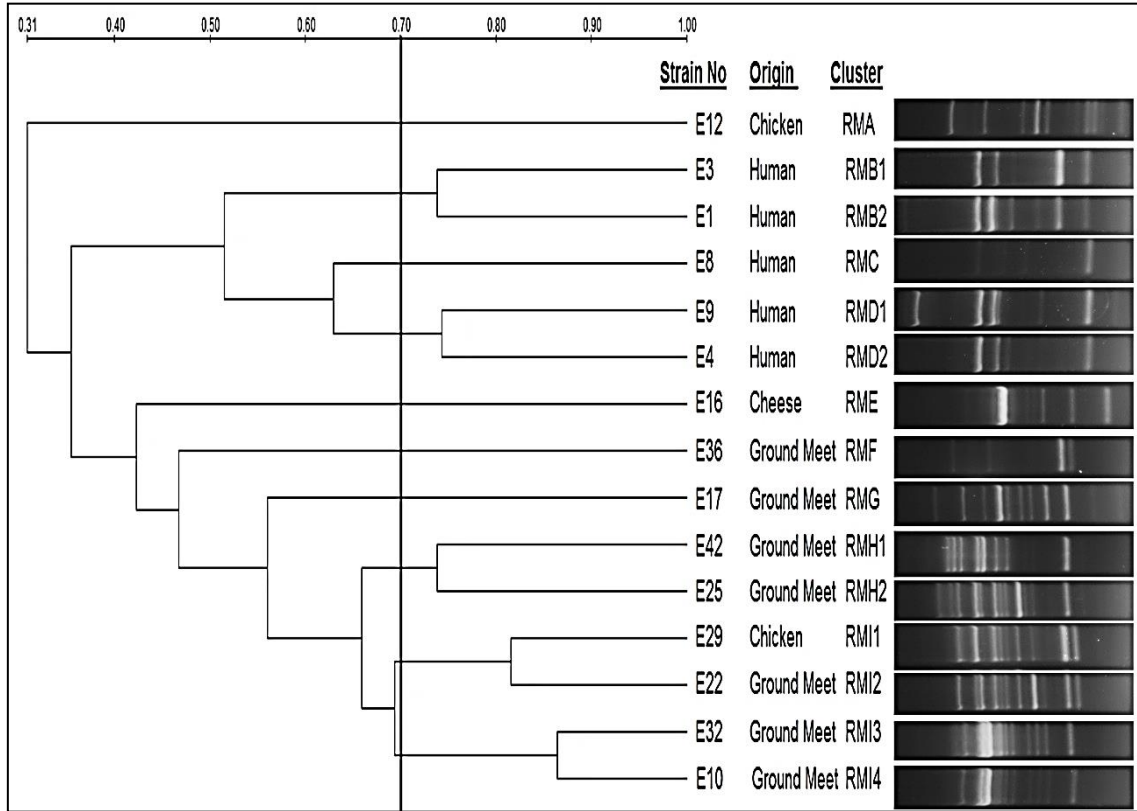
Çizelge 3.3. Tavuk örnekleri ve izolat kodları.

Adet	İzolatların Kodları	İzole Edildiği Yer	Katalaz	%6.5 NaCl	Gram Boyama	PZR sonucu
1	E 11	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
2	E 14	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
3	E 19	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
4	E 28	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
5	E 37	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
6	E 41	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
7	E 47	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
8	E 48	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecalis</i>
9	E 12	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecium</i>
10	E 29	Tavuk	-	+	+	<i>E. faecium</i>

Şekil 3.2. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının izolat kaynaklarına göre sayısal değerleri.



Şekil 3.3. *E. faecalis* suşlarının UPGMA analiz programına göre gruplarını gösteren dendrogram.



Şekil 3.4. *E. faecium* suşlarının UPGMA analiz programına göre gruplarını gösteren dendrogram.

3.3. RAPD-PZR

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının genetik çeşitliliği RAPD-PCR yöntemiyle M13 primeri kullanılarak araştırıldı.

Araştırılan bütün izolatlar M13 primeri ile bant oluşturdu ve sonuçlar UPGMA küme analiz programıyla değerlendirildi. *E. faecalis* suşları profillerinin küme analizleri sonucunda %70'ten fazla benzerlik gösteren 2 grup ve benzersiz 14 tip içeren 26 farklı tip gözlemlendi. *E. faecium* suşları profillerinin küme analizleri sonucunda %70 benzerlik baz alındığında benzerlik gösteren 5 ana grup ve 10 benzersiz tip gözlemlendi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enterokoklar geniş pH aralığı, yüksek sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonları gibi zor koşullara adapte olabildikleri ve pastörizasyon sıcaklıklarında varlıklarının sürdürebildikleri için, et ve süt gibi çiğ materyalden üretilen gıdalar ile ısıtılmış gıda ürünlerinden sıkça izole edilmektedirler. Bütün ürün işleme süreçlerinden canlı olarak çıkabildikleri için son ürünü kontamine ederek özellikle fermente etler ve peynirlerde gıda florasının büyük bir çoğunluğunu oluştururlar (Franz ve ark., 2003; Giraffa, 2003). Enterokokları barındıran bu fermente gıdalar bu güne kadar güvenli kabul edilmesine rağmen, son zamanlarda gıda endüstrisi ve tüketiciler bu bakterilerin gıdalardaki varlığından kaygı duymaktadırlar (Cariolato vd., 2008). Çünkü yapılan araştırmalarda bu bakteriler gıda bozulmalarından, hastane enfeksiyonlarından ve gıda zincirinde bulunan güvenilir suşlarda antibiyotik dirençliliğinin yayılmasından sorumlu tutulmaktadır (Valenzuela vd., 2008).

Dünyada yapılan çalışmalarda Gomes ve arkadaşlarının Brezilya'nın geleneksel gıda ürünlerinden 299 örnekle yaptıkları Enterokok varlığı araştırmasında 139 adet *E. faecium* (%46,5) ve 80 adet *E. faecalis* (%26,8) gibi yüksek bir oranla izole edilerek tanımlandığı bildirilmiştir (Gomes vd., 2008). Yine Barbosa ve arkadaşlarının Portekiz'in kuzeyinde üretilen 182 et ürününde yaptıkları araştırmada, *E. faecium* (76), *E. faecalis* (44) ve *Enterococcus* spp. (61) izole edilmiştir (Barbosa vd., 2010).

Ülkemizde ise Toğay ve arkadaşlarının geleneksel Türk peynirlerinde Enterokokların antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde yaptıkları araştırmada 34 peynir örneğinden 66 adet Enterokok suşu izole ederken (Toğay vd., 2016), diğer bir çalışmada (20) peynir, (10) sosis ve (20) zeytin örneklerinden 16 *E. faecium*, 68 *E. faecalis* izole edildiğini bildirilmiştir (Toğay vd., 2010). Yine kırmızı et kıyması ve tavuk etinde Enterokok varlığı üzerine Mersin'de yapılan bir araştırmada Bayram ve arkadaşları 40 adet kırmızı et kıyması örneğinden 11'inde (%27,5) Enterokok suşları saptamışlar ve izole edilen 12 Enterokok suşundan 5'i *E. Faecalis* ve 2'si *E. facium* olarak tanımlamışlardır. Aynı çalışmada 40 adet tavuk örneğinin 5'inde (%12,5) Enterokok türü tespit edilmiş bunlarında 2'si *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır (Bayram vd., 2011). Peynirlerde Enterokok varlığının araştırıldığı bir çalışmada Çıtlak ve arkadaşları Ankara'dan topladıkları 30 peyaz peynir örneğinde 62 *E. faecalis* (%61,3) ve 25 *E. faecium* (%24,7) izole edildiğini bildirmişlerdir (Çıtlak vd., 2004). Dumani ve arkadaşlarıda Erzurum ve çevresindeki 18 farklı peynir türünde *E. faecalis* varlığını araştırmışlar fakat sadece 6 örnekten farklı Enterokok suşları izole edebilmiş ve *E. faecalis* varlığına rastlamamışlardır (Dumani vd., 2015).

Bu çalışmada Kütahya İlinde farklı marketler ve kasap işletmelerinden Ekim 2014-Eylül 2015 alınan 35 tavuk kanat örneğinden 8 adet *E. faecalis* ve 2 adet *E. faecium*, 35 kıyma örneğinden 5 *E. faecalis* ve 7 *E. faecium*, 35 peynir örneğinden 7 *E. faecalis* ve 1 *E. faecium* izole edildi. Ayrıca 5 *E. faecalis* ve 5 *E. faecium* insan Enterokok suşları Evliya Çelebi Hastanesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edildi. Toplamda 25 *E. faecalis* ve 15 *E. faecium* olmak üzere 40 izolatla çalışıldı. Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalardan verilen sayısal değerler, incelenen örnek sayıları arttıkça Enterokok suşlarının izole edilme şansında arttığını göstermektedir.

Genotiplendirme yöntemlerinde temel prensip, DNA'nın belirli restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan DNA parçacıklarının, elektrik akımıyla agaroz jel veya akrilamid jelde göç ettirilerek parça büyüğüne göre ayrıştırılması ve ayrılan parçaların jelde oluşturdıkları bandların ethidium bromide ile boyanarak ya da işaretli problemler kullanarak görüntülenmesidir. Kromozomal DNA, belirli gen bölgeleri, plazmid veya mitokondriye ait DNA genotiplendirme yöntemleriyle araştırılabilmektedir. PZR tüm bu yöntemlerin temelini oluşturur (Mullis vd., 1986). Rastgele arttırılmış polimorfik DNA yöntemi de PZR temelli bir yöntemdir (Welsh ve McClelland., 1990). RAPD yöntemi DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanması ve PZR ile çoğaltma yapmasıdır. Oluşan çoğaltma ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve oluşturdıkları bantlar değerlendirilir (Williams vd., 1990). Günümüzde genotiplendirmede kullanılan DNA temelli teknikler; Çoğaltılmış parça polimorfizm (AFLP), kesilmiş amplifiye polimorfik dizi (CAPs), tek zincir konformasyonel polimorfizm (SSCP), denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE), restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), basit dizi tekrarı mikrosatellit (SSR), basit dizi tekrarları arası (ISSR) ve amplifiye edilmiş karakterize dizi bölgesi (SCARs)'dir.

RAPD tekniği diğer tekniklerle karşılaştırıldığında en önemli avantajı araştırılan örneklerin genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgiye ihtiyaç duymamasıdır (Williams vd., 1990; Welsh ve McClelland., 1990). Çoğaltılmak istenen tüm organizmalarda aynı primer seti kullanılabilir ve bu primerler rastgele özgün bölgelere bağlanarak çoğaltma yaparlar. Aynı primer, farklı organizmaların DNA dizilimleri farklı olacağından meydana gelecek RAPD belirteçleri de farklı olacaktır (Glick ve Pasternak 1998). Bu fark araştırılan organizmaların karşılaştırılması sağlandığından, radyoaktiviteye, DNA hibridizasyonuna veya Southern transferlere gerek duyulmaz. Kullanılan primer sayıları arttıkça sonuçta oluşan bant sayısında artmaktadır ve bu yönüyle türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır (Tingey vd Del., 1993; Hallden., 1998).

Bu çalışmada konvansiyonel yollarla identifikasyonu yapılan 30 adet şüpheli Enterokok suşu ve hastane kaynaklı 10 adet Enterokok suşu, tür tespiti amacı ile PZR işlemine tabi tutuldu. Bu işlem sonunda gıda kaynaklı şüpheli suşlarda 20'si *E. faecalis* ve 10'u *E. faecium* olarak saptandı. *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının genetik çeşitliliği RAPD-PZR yöntemiyle M13 primeri kullanılarak araştırıldı. İncelenen tüm izolatlar M13 primeri ile bant oluşturdu. Böylece bütün suşların genetik çeşitlilik ve yakınlıkları gözlemlenebildi.

İndikatör mikroorganizmalar olarak en önemli grup fekal kontaminasyon indeksi bakterilerdir. Bunların varlığı gıdaya hammaddeye başlayıp gıdanın taşınmasına kadar bir ya da daha fazla aşamada doğrudan ya da dolaylı olarak lağım ile dışkı bulaştığının göstergesidir. Enterokoklar, *Clostridium perfringens* ve *E. coli* gibi fekal kontaminasyon göstergesi olarak kabul edilmektedir (Biorollo vd., 2001). İndikatör mikroorganizmalar gıda sanayinde önemli bir kontrol elemanıdır. Yapılan bazı araştırmalarda indikatör mikroorganizmaların mutlaka dışkı kökenli olması gerektiği diğer bazı araştırmalarda ise her türlü mikroorganizmanın indikatör olarak kabul edilebileceği bildirilmektedir (Chen ve Wong, 1994). Ülkemizdeki dondurulmuş gıdaların üretim, paketlenme ve depolama aşamalarındaki hijyen durumlarının belirlenmesi için koliform mikroorganizma ve *E. coli*'ye oranla kurutma ve dondurma gibi olumsuz şartlara daha dayanıklı olan fekal Enterokokların da indikatör mikroorganizma olarak mikrobiyolojik kriterler içerisinde yer alması gerekliliğini göstermektedir (Çıtlak vd., 2010). Hayvanların gastrointestinal sisteminde de Enterokok bulunması kesimhanelerde ete bulaşma potansiyelini arttırmaktadır (Klein, 2003; Franz vd., 1999).

Bu çalışmada gıdalarda fekal kontaminasyon indikatörü olarak Enterokokların varlığı araştırıldı. Ayrıca izole ve identifiye edilen Enterokokların hastane orjinli izolatlar ile genotipik yakınlıkları değerlendirildi. Bu kapsamda Kütahya İlinde farklı marketler ve kasap işletmelerinden Ekim 2014-Eylül 2015 alınan 35 tavuk kanat örneğinden 8 adet *E. faecalis* ve 2 adet *E. faecium*, 35 kıyma örneğinden 5 *E. faecalis* ve 7 *E. faecium*, 35, peynir örneğinden 7 *E. faecalis* ve 1 *E. faecium* izole edildi. Ayrıca 5 *E. faecalis* ve 5 *E. faecium* insan Enterokok suşları Evliya Çelebi Hastanesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edilmiştir. Toplamda 25 *E. faecalis* ve 15 *E. faecium* olmak üzere 40 izolatla çalışıldı. Kütahya ilinde incelenmiş olan tüketime hazır gıdalarda *E. faecalis* ve *E. faecium* tespit edildi ve insan izolatları ile genotipik benzerlikleri karşılaştırıldı ve suşlar arasında benzerlik saptanmadı. Adana'da Terkuran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, gıdalardan izole edilmiş 51 *Enterococcus spp.* ile klinik kökenli 50 *E. Faecium* genotipik olarak karşılaştırılmış ve sonuç olarak gıda ve klinik izolatlar arasında genetik bir ilişki saptanmamıştır (Terkuran vd., 2014). Bu sonuç gıdaların insanlar için risk oluşturmadığı kanısına varmamıza sebep olmakla birlikte

incelenen suşlarının sayısının artırılmasının benzerlik yakalama olasılığına etkisi olabileceği düşünülmektedir.

İnsan Enterokok suşlarının genotipleri tür bazında değerlendirildiğinde çok farklı genotipte gruplar oluşturdıkları ve yüksek heterojeniteye sahip oldukları kanısında varıldı. Gıda orijinli *E. faecalis* suşları incelendiğinde kıyma-tavuk ve kıyma peynir orijinli suşlar arasında %70 üzerinde benzerlik saptanması bu suşlar arasında ilişki olabileceğini göstermektedir. *E. faecium* suşlarının genotipleri incelendiğinde sadece bir adet *E. faecium* tavuk (E29) ve kıyma (E22) örneğinde %70 üzerinde benzerlik tespit edildi. Bununla birlikte *E. faecalis* suşlarında ise sadece bir peynir örneği (E43) ile iki kıyma örneği arasında (E23, E49) %70 üzerinde benzerlik tespit edildi.

Gıda orijinli suşlar farklı tarihlerde ve Kütahya'nın farklı bölgelerindeki perakende işletmelerden temin edildi. Dolayısı ile çalışma sonucunda suşlar arasında tespit edilen yüksek genotipik benzerliğin canlı hayvanların bir arada yetiştirildiği çiftliklerden ziyade ürünlerin satışa çıktığı son basamakta gerçekleşmiş olma olasılığı yüksektir.

Çalışmada gıda orijinli ve insan orijinli suşlar arasında benzerlik saptanmaması Enterokoların halk sağlığı açısından risk oluşturma olasılığının düşük olduğunu düşündürmektedir. Ancak insan enfeksiyonlarından sorumlu olan *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin insanlardan izole edilen klinik suşları yüksek heterojenite göstermiştir. Aynı hastaneden izole edildiği düşünüldüğünde ortaya çıkan bu yüksek heterojenitenin altında yatan sebebin gen transferleri olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aydın, M., (2004), Bakteri identifikasyonunda kullanılan standart biyokimyasal ve fizyolojik testler, Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji, 11, s.91-110.
- Baddour, L. M., G. D. Christensen, W. A. Simpson, ve E. H. Beachey. (1990), In G. L. Mandell, R. G. Douglas, Jr., ve J. E. Bennett (ed.), Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York. s.9-25.
- Barbosa, J., Gibbs, P. A., ve Teixeira, P. (2010), Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21(5), s.651-656
- Başustaoğlu, A., Aydoğan, H., Beşirbellioğlu, B., (2000), GATA’da izole edilen ikinci glikopeptid direnci *E. faecium*, XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği s. 349.
- Başustaoğlu, A., Aydoğan, H., (2002), Enterokoklar. Ed: Uzun Ö. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 5 s.45-60.
- Başustaoğlu, A., (2004), Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara s.141-158.
- Bayram, G., Delialioğlu, N., ve Emekdaş, G. (2011), Mersin İlinde Tüketime Sunulan Etlerden İzole Edilen Enterokok Türlerinin Prevalansı ve Tiplendirilmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 4(2)
- Bensing, B.A., Dunny, G.M., (1993). Cloning and molecular analysis of genes affecting expression of binding substance, the recipient-encoded receptor(s) mediating mating aggregate formation in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 175, s.7421-7429.
- Beresford, T.P., (2003). Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality. Dairy Processing: Improving Quality, Edited by G. Smit, CRC Pres, Woodhead Publishing Limited, England, s.448-469.
- Billström, H., (2008), Molecular epidemiology of clinical *Enterococcus faecium*, Thesis, Stockholm Karolinska Institutet, s.61.
- Birollo, G.A., Reinheimer J.A., Vinderola C.G., (2001), Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology*, 18, s.597-604
- Bourgogne, A., Garsin, D.A., Qin, X., Singh, K.V., Sillanpaa, J., Yerrapragada, S., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Buhay, C., Shen, H vd., (2008), Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. Genome Biol, 9, s.110.
- Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G., Danny, G.M., Murray, B.E., (2006) Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol* 188, s.2875-2884.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A., (2008), Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19, s.886-892.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, L., Wong, H., Yu, C., (1994), Occurrence of Vibrios in frozen seafoods and survival of psychotrophic *Vibrio cholerae* in broth and shrimp homogenate at low temperatures. *Journal of Food Protection*,; 58, s.263-7.
- Clewell, D.B., (1993), Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer, *Cell*, s.73, 9-12.
- Coque, T.M., Willems, R.J.L., Fortu'n, J., Top, J., Diz, S., Loza, E., Canto'n, R., Baquero, F., (2005), Population Structure of *Enterococcus faecium* Causing Bacteremia in a Spanish University Hospital, Setting the Scene for a Future Increase in Vancomycin Resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 49, s.2693-2700.
- Coudron, P.E., Myhall, C. G., Facklam, R. R., vd., (1984), *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol*, 20, s.1044– 8.
- Cox, C.R., Coburn, P.S., Gilmore, M.S., (2005), Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*. 6, s.77-84.
- Çetinkaya, Y., (2000), Vankomisine Dirençli Enterokoklar: Epidemiyoloji ve Kontrol. *Flora*. 5(1), s.24-33.
- Çetinkaya, F., ve Tülay, E.L.A.L., (2010), Yararları ve Riskleriyle Gıda Kaynaklı Enterokoklar. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 29(1), s.77-83
- Çetinkaya, Y., Falk, P. ve Mayhall, C.G., (2000), Vancomycin-resistant enterococci, *Clin. Microbiol. Review*, 13, 4, s.686- 707.
- Çıtak, S., Gündoğan, N., ve Kala, E., (2010), Ankara İlindeki Dondurulmuş Et Ve Sebzelerde Koliform Ve Enterokokların Fekal İndikatör Bakteri Olarak Değerlendirilmesi. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, s.145-151.
- Çıtak, S., Yücel, N., Orhan, S., 2004. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57(1), s.27-31.
- Çiftçi, A., (2004), Tavukların deneysel amiloid artropatisinde Enterokok virulens faktörlerinin rolü, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji, s.81.
- Çolakoğlu, F.A., Ova, G., Köseoğlu, B., (2006), Taze ve işlenmiş gümüş balığının (*Atherina boyeri* Risso,1810) mikrobiyolojik kalitesi. *E.Ü.Su ürünleri Dergisi*, 23(1/3), s.393-5.
- Depardieu, F., B. Perichon, ve P. Courvalin, (2004), Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*. 42, s.5857–5860.
- Derbentli, Ş., (1998), Nozokomiyal Enterokok enfeksiyonları. *Galenos*. 1998;23: 14-17
- Devriese, L., Baele, M., Butaye, P., (2006), The genus *Enterococcus*, *The Procaryotes*, New York, Springer, s.163–174
- Devrim, A.K., Kaya, N., (2006), RAPD Tekniği ve Biyokimya Alanında Kullanımı, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 12(1), s.97-101
- Dumanı, A., Yoldaş, O., Akçimen, B., Yılmaz, Ş., ve Köksal, F. (2015), Farklı Çeşitteki Türk Peynirlerinde *Enterococcus Faecalis* Türünün Tespiti. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 25(1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Durmaz, R., Durmaz, B., Bayraktar, M., vd., (2003), Prevalence of group a streptococcal carriers in asymptomatic children and clonal relatedness among isolates in Malatya, Turkey. J Clin Microbiol 41, s.5285-7.
- Eaton, TJ., Gasson, MJ., (2001), Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol 67, s.1628-1635.
- Eaton, TJ., Gasson, MJ., (2001), Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol 67, s.1628-1635.
- Edwards, DD., (2000), Enterococci attract attention of concerned microbiologists. ASM News 66, s.540-545.
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Zbigniew Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst O, Huebner J, (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial pep-tides. Infect Immun. 74, s.4164-4171.
- Facklam, R.R., Teixeira, L.M., (1998), Enterococcus. In: Collier L, Bolows A, Sussman (eds). Topley ve Wilson's Microbiology and Microbial infections. Cilt 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edward Arnold, 9th edition. London, s.669-682.
- Facklam, R.R., Sahm, D.F., Teixeira, L.M., Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, Y.H., (1999), Manual of clinical microbiology. Washington: ASM, s.297-305.
- Fisher, K., ve Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology, 155(6), s.1749-1757.
- Foulquie, Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., (2006), The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microbiol, 106, 1-24, s.37.
- Fraimow, HS., Fraimow, P., (2000), Resistance to glycopeptides in Gram positive pathogens. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI (eds), Gram-Positive Pathogens, ASM Press, Washington D.C., s.621-634,
- Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., ve Holzapfel, W. H. (2003), Enterococci in foods a conundrum for food safety. International journal of food microbiology, 88(2), s.105-122.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., (1999), Enterococci at the crossroads of food safety. Int. J. Food Microbiology, 47, s.1-24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. ve Holzapfel, W.H., (2003), Enterococci in foods a conundrum for food safety, Review article, Int. J. Food Microbiol., 88, s.105– 122.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., Cogan, T.M., (2001), Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. Int. J. Food Microbiol. 71, s.177-188.
- Glick B.R., Pasternak J.J., (1998), Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA), ASM Press., Washington, D.C.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., ve De Martinis, E. C. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25(5), s.668-675
- Grundmann, H., Hori, S., Tanner, G., (2001), Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *J Clin Microbiol* 39, s.4190–4192.
- Guiton, P.S., Hung, C.S., Kline. K.A., Roth. R., Kau. A.L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K.W., Caparon, M.G., Hultgren, S.J., (2009), Contribution of autolysin and Sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect Immun* 77, s.3626–3638.
- Guiton, P.S., Hung, S., Kline, K.K., Roth, R., Kau, A.L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K.W., Caparon, M.G. ve Hultgren, S.J., (2009), Contribution of autolysin and sortase during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development, *Infection And Immunity*, 77,9, s.3626–3638.
- Gultekin, M., (2004), Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. Önemli ve Sorunlu Gram pozitif Bakteri Enfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi; s.121 – 40.
- Gültekin, M., Günseren, F., (2000), Vankomisine Dirençli Enterokoklar. Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 4, s.195-204.
- Gürsoy, O., ve Kınık, Ö., (2006), Peynir Teknolojisinde Enterokoklar–II: Koruyucu ve Probiyotik Kültür Olarak Kullanımları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 43(3), s.91-100
- Haas, W., Shepard, B.D., Gilmore, M.S., (2002), Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing. *Nature*, s.415:84-87.
- Hällgren, A., Claesson. C., Saeedi, B., Monstein, H.J., Hanberger, H., Nilsson, L.E., (2009), Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol*. 299, s.323-332.
- Halldén, C., (1998), Characterization and Use of a Multiplex PCRbasedSystem: Random Amplified Polymorphic DNA, Ph.D.Thesis, Department of Genetics Lund University, Lund.
- Hanage, W.P., Feil. E.J., Brueggemann, A.B., Spratt, B.G., (2004), Multilocus sequence typing: Strain characterization, population biology, and patterns of evolutionary descent. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. Washington DC: ASM Press, s.235-43.
- Hendrickx, A. P., Willems, R. J., Bonten, M. J., ve van Schaik, W. (2009). LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends in microbiology*, 17(9), s.423-430.
- Herman, D. J., Gerding D. N., (1991), Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother*, 35 (1), s.1-4.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., ve Fridkin, S.K., (2008), NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, s.996–1011.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hsieh, S.E., (2000), Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci, J. Microbiol. Immunol Infect, 33, s.253-257.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T., (2003), Functionality of enterococci in meat products. Int J Food Microbiol, 88, s.223-233.
- Huycke, M.M., Sahm, D.F., Glimore, M.S., (1998), Multiple Drug Resistant Enterococcus; The Nature of the Problem and Agenda for the Future. Emerging Infectious Diseases. 4(2), s.239-249.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Demirpençe, Y., Yıldırım, M., (2008), Enterokoklar: Biyokimyasal, fizyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile patojenitesi. Derleme makale. Akademik Gıda, 6(3), s.16-26.
- Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., ve Barrett, J. B. (2004), Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 42(8), s.3558-3565.
- Jett, B.D., Huycke, M. M., ve Gilmore, M.S., (1994), Virulence of enterococci. Clinical microbiology reviews, 7(4), s.462-478.
- Jones, R.N., Marshall, S.A., Pfaller, M.A., Wilke, W.W., Hollis, R.J., Rwin, M.E., Edmond, M.B., Wenzel, R.P., (1997), the SCOPE Hospital Study Group. Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE Program: Antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results and laboratory accuracy. Diagn Microbiol Infect Dis 29, s.95-102.
- Jureen, R., Harthug, S., Sornes, S., Digranes, A., Willems, R.J., Langeland, N., (2004), Comparative analysis of amplified fragment length polymorphism and pulsed field gel electrophoresis in a hospital outbreak and subsequent endemicity of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. FEMS Immunol Med Microbiol, 40, s.33-9.
- Jurtura, C.C., ve Lorenzelli, (1994), Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. Microbiol. Res. 149, s.203-213
- Kayaoglu, G., Orstavik, D., (2004), Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship To Endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med, 15, s.308-320.
- Kaye, D., (1982), Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. Arch. Intern. Med. 142, s.2006-9.
- Klein, G., (2003), Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. Review. Int J Food Microbiol, 88, s.123-131.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., Huebner, J., (2004), Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine. 22, s.822-830.
- Koluman, A., Akan, L.S., Çakiroğlu, F.P., (2009), Occurrence and antimicrobial resistance of Enterococci in retail foods. Food Control, 20, s.281-283.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., Procop, G., Woods, G., (2005), Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co, s.700-711.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koneman, E.W., Allen, S.D., JANDA, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., (2006), Identification of Enterococcus Species - Kit Systems For Identifying Enterococci. Diagnostic Microbiology. New York, Lippincott-Raven Publishers, s.597-649.
- Korten, V., (1996), "Enterokokal Enfeksiyonlar". İlicin G, Biberoğlu K, Unal S, Suleymanlar G. Temel İç Hastalıkları. Ankara. Melisa Matbaacılık, cilt 2, s.2173- 2175.
- Korten, V., (2002), Enterokoklar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 2.baskı. İstanbul s.1497-1506.
- Köksal, F., (1999), Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane enfeksiyonlarında kullanımı, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, s.11.
- Kreft, B., Marre, R., Schramm, U., Wirth, R., (1992), Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubuler cells. *Infect. Immun*, 60 (1), s.25 – 30.
- Krieger, J. N., Kaiser, D. L., Wenzel, R. P., (1983), Urinary tract etiology of bloodstream infections in hospitalize patients. *J. Infect. Dis.*, s.148, s.57 – 62.
- Lefort, A., Mainandi, J.L., Tod, M., (2000), Lortholory O. Antienterococcal antibiotics. *Med Clin North Ame*, 6, s.1471-1495.
- Linden, P.K., Pasculle, A.W., Manez, R., vd., (1996), Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *E. faecium* or vancomycin susceptible *E. faecium*. *Clin. Infect. Dis*, 22, s.663 -70.
- Livornese, L.L.Jr., Drus S., Jamel C., vd.. (1992), Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *E. faecium* transmitted by electronics thermometers. *Ann. Intern. Med.*, 117, s.112 – 6.
- Teixeira, L.M., Siqueira, M.G., Carvalho, Shewmaker, P.L., Facklam, R.R., (2011), Enterococcus. In: Manuel of Clinical Microbiology, Eds: J Versalovic, KC Carroll, G Funke. Cilt 1 Eds: JH Jorgensen, ML Landry, DW Warnock. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC.
- Low, Y.L., Jakubovics, N.S., Flatman, J.C., Jenkinson, H.F., Smith, A.W., (2003), Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol*. 52, s.113-119.
- Lowe, A.M., Lambert, P.A., Smith, A.W., (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun*. 63, s.703-706.
- MacCallum, W.G., ve Hastings, T.W., (1899), A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *J. Exp. Med*. 4, s.521–534.
- Magnus, C.A., McCurdy, A.R., Ingledew, W.M., (1988), Evaluation of four media for recovery of heat-stressed streptococci. *J. Food Prot.*, 51, s.895-897.
- Mathieu-Daudé, F., Ralph D. ve McClelland M., (1997), Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA, ed. Taylor, G. R., CRS Press, Boca Raton.
- Matyar, F., ve Dinçer, S., (2010), Doğu Akdeniz'den İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Bakterilerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençliliği. *SDÜ Fen Dergisi*, 5(2), s.172-178)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Megron, D. W., (1992), Enterococcal endocarditis. Clin. Infect. Dis., 15, s.63–72.
- Mete, E., (2003), Besicilerde Vankomisine Dirençli Enterokok Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, s.4.
- Meyer, K., ve Schonfeld, H., (1926), Über die Unter sheidung des Enterococcus vom Streptococcus viridans und die Beziehung der beiden zum *Streptococcus lactis*. Zentralbl. Bakteriöl. Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. I. Orig. 99, s.402-416.
- Moellering, J.C., (2000), “Enterococcus Species”. In Mandell G. L, vd., Principles and Practise of Infectious Diseases, 5th Ed. NewYork: Churcill Livingstone s.2147-2156.
- Moellering, R.C.Jr., (1981), Infections due to group D streptococci. Infect. Dis. Rew. 6, s.1–7.
- Mohamed, J.A., Teng, F., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E., (2006), Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* sagA-like genes, salA and salB, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. J Infect Dis 193, s.231–240.
- Mohamed, J., ve Huang, D.B., (2007), Biofilm formation by Enterococci, Journal of Medical Microbiology, 56, s.1581-1588.
- Mullis, K., Faloona F., Scharf, S., Saiki R., Horn, G. ve Erlich H., (1986), Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction., Cold Spring Harbour Symp Quant Biol 51, s.263-273.
- Murray, B. E., (1990), The life and times enterococcus. Clin. Microbiol. Rev. 3, s.45–65.
- Murray, B.E., (1998), “Diversity Among Multidrug Resistant Enterococcus”. Emerging Infectious Diseases. nosocomial, community, and animal sources in the United States. (1), s.37-47.
- Murray, B.E., Mederski-Samoraj, B., (1983), Transferable beta-lactamase a new mechanism for in vitro penicillin resistance in Streptococcus faecalis. J Clin Invest; 72, s.1168-1171
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., ve Pfaller, M.A. (2013), Medical microbiology. Elsevier/Saunders, Philadelphia, USA.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Sillanpaa, J., Garsin, D. A., Hook, M., Erlandsen, S. L., Murray, B. E., (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J Clin Invest 116, s.2799–2807
- Nallapareddy, S.R., vd., (2003), Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. Mol. Microbiol. 47, s.1733–1747
- Nallapareddy, S.R., vd.. (2006), Construction of improved temperaturesensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding acm gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 72, s.334–345
- Oancea, C., Klare, I., Witte, W., Werner, G., (2004), Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54, s.232-235.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ogier, J.C., Serror, P., (2008), Safety assesment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. Int J Food Microbiol, 126, s.291-301.
- Paulsen, I.T., Banerjei, L., Myers, G.S., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., vd., (2003), Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299, s.2071-2074.
- Pinto, B., Pierotti, R., Canale, G., Reali, D., (1999), Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*, 29, s.258
- Psoni, L., Kotzamanides, C., Andrighetto, C., Lombardi, A., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., (2006), Genotypic and phenotypic heterogeneity in Enterococcus isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. Int J Food Microbiol., 109, s.109-120.
- Rademaker, J.L.W., Savelkoul, P., (2004), PCR amplification-based microbial typing. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds), Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. Washington DC: ASM Press, s.197-221.
- Rice, L.B., (2001), Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* 7, s.183-7
- Rochaix, A., (1924), Millieux a leculine pour le diagnostid differentiel des bacteries du groups strepts-entero pneumocoque. *Comt. Rend. Soc. Biol.* 90, s.771-772.
- Ruoff, K.L., R.A. Wiley, ve D. Beighton. (1999), Streptococcus, In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., s.283-296.
- Ryu, C., Lee, K., Hawng, H.J., Yoo, C.K., Seong, W.K., Oh, H.B., (2005), Molecular characterization of Korean Bacillus anthracis isolates by amplified fragment length polymorphism analysis and multilocus variable-number tandem repeat analysis. Appl Environ Microbiol, 71, s.4664-71.
- Terkuran, M., Erginkaya, Z., Ünal, E., Gökmen, T., Kızılyıldırım, S., ve Köksal, F. (2014). Comparison of genotypic diversity and vancomycin resistance of Enterococci isolated from foods and clinical sources in Adana region of Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*, 20(1), s.121-128.
- Sağlam, Y.F., (2008), Enterokoklarda VanA tipi glikopeptid direncine aracılık eden genetik elemanların moleküler analizi, Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D., s.68
- Sannomiya, P., Craig, R.A., Clewell, D.B., Suzuki, A., Fujino, M., Till, G.O., Marasco, W.A., (1990), Characterization of a class of nonformylated *Enterococcus faecalis*-derived neutrophil chemotactic peptides: the sex pheromones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, s.66-70.
- Sanz, Pérez, B., López, Lorenzo, P., García, M.L., Hernández, P.E., Ordoñez, J.A., (1982), Heat resistance of enterococci. *Milchwissenschaft*, 37, s.724-726.
- Savaşan, S., Kaya, O., Kırkan, Ş., Çiftçi, A., (2008), Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55, s.107-110.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sayiner, H.S., (2008), Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği süreyansla saptanan VRE'lerin dağılımı, antibiyotik duyarlılıkları ve kolonize hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi, 1, s.65
- Scott, G. M. S., (2000), "Enterokoklarda Vankomisin Direnci ile Mucadele".
- Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W., Gilmore, M., (2004), Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. International Journal of Medical Microbiology, 293, s.609-618.
- Sharpe, M.E., Shattock, P.M.F., (1952), The Serological Typing of Group-D Streptococci Associated with Outbreaks of Neonatal Diarrhoea. J.Gen. Microbiol. 6, s.150–165.
- Sillanpää, J., Prakash, V.P., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E., (2009), Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 47, s.896-901.
- Sillanpää, J., vd., (2008), Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. Microbiology 154, s.3199–3211
- Soll, D.R., Lockhart, S.R., Pujol, C., (2003), Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Tenover JC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press, s.139-61.
- Stosor, V., Noskin, G.A., Peterson, L.R., (1996), "The Management of VRE" . Infect. Med. 91 1996; 13(6), s.487-488, s.493-498.
- Svec, P., Devriese, L.A., Sedlacek, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., Donskar, J., (2001), *Enterococcus haemolyticus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, s.1567-1574.
- Swan, A., (1954), The use of bile-esculin medium and of Maxted's technique of Lancefield grouping in the identification of enterococci (group D streptococci). J. Clin. Pathol. 7, s.160-163.
- Şardan, Y.Ç., (2004), Enterokoklarda direnç sorunu. Ed: Şardan YÇ. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, s.10-16.
- Taşova, Y., İnal S., (2004), Enterokok enfeksiyonlarında klinik. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar, s.17 – 22.
- Teixeira, L.M., Carvalho, M. G. S., Shewmaker, P. L., Facklam, R. R., (2011), Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: ASM Press, 350–364
- Teuber, M., Perreten, V., Wirsching, F., (1996), Antibiotikumresistente Bakterien: eine neue Dimension in der Lebensmittelmikrobiologie. Lebensm.-Technol. 29, s.182–199.
- Tingey, S.V., Del Tufa, J.P., (1993), "Genetic Analysis With Random Amplified Polymorphic DNA Markers", Plant Physiol. 101, s.349-352.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toğay, S., Keskin, A., Aık, L., Temiz, A., (2010), Virulence Genes, Antibiotic Resistance And Plasmid Profiles Of *Enterococcus faecalis* And *Enterococcus Faecium* From Naturally Fermented Turkish Foods. *Appl Microbiol* 109(3), s.1084-92
- Toğay, S.Ö., Keskin, A.Ç., Aık, L., (2010), Temiz A. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *E. faecalis* and *E. faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J appl Microbiol*;109, s.1084-92
- Toğay, S., Ay, M., Sandıkı Altunatmaz, S., Aksu, F., Erol, Ö., Issa, G., ve Byknal, S. K. (2016), Antimicrobial Activity Potential Of *Enterococcus* Spp. Isolated From Some Traditional Turkish Cheeses. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*
- Tomayko, J. F., ve B. E. Murray., (1995), Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 33, s.2903-2907.
- Trovatelli, L.D., Schiesser, A., Massa, S., (1987), Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw and sheep milk. *Milchwissenschaft* 42(11), s.717-719.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS), (2015) “*Enterococcus faecalis/faecium*: Tanımlanması ve AMD Testleri (Vankomisin direnci, yüksek düzey aminoglikozit direnci)” s.4
- Unal, S., (1993), “Gram pozitif Bakterilerde Değışik antibiyotiklere Direnc Mekanizmaları”. Akalın E, Akan O. A, Gur D, Ozkuyumcu C, Akalın S. Direnc Mekanizmaları ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri.
- Upadhyaya, P.M.G., Ravikumar, K.L., Umapathy, B.L., (2009), Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*.; 27, s.301-305.
- Uttley, A.H.C., Collins, C.H., Naidoo, J., George, R.C., (1988), Vancomycin resistant enterococci. *Lanset*;1, s.57-58.
- nltrk, A., Turantaş, F., Temiz, A., (1998), Gıdalarda indikatör mikroorganizmalar (Eds). *Gıda Mikrobiyolojisi*. İzmir: Mengi Tan Basımevi, s.88-104.
- Vael, C., Goossens, H., (2002), Enterococci as probiotics: Chances and challenges. Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, European Commission Project FAIR-CT97-3078, Berlin, Germany.
- Valenzuela, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H, Lopez R.L., Ortega, E, Canamero, M.M., Galvez, A., (2008), Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol*, s.46, 2648-2652.)
- Van, Wamel., J.B.W., Hendrickx, P.A.A., Bonten, M.J.M., Top, J., Posthuma, G. and Willems, R.J.L., (2007), Growth condition-dependent esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation, *Infection And Immunity*, 75, 2, s.924–931.
- Vankerckhove, N.V., Autgaerden, T.V., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H., (2004), Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 42, s.4473-4479.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vautor, E., Jay, C., Chevalier, N., Visomblin, N., Vernet, G., Pepin, M., (2005), Characterization of 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, predominantly from dairy sheep, using four different techniques of molecular epidemiology. *J Vet Diagn Invest* 17, s.363-8.
- Versalovic, J., Lupski, J.R., (2002), Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *Trends Microbiol.* 10, s.15–21.
- Versteeg, L., (1997), Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* Infections Review of the Literature. Chapter I.
- Welsh, J., McClelland, M., (1990), "Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers", Nucleic Acids Research, Cilt 18, s.7213-7218.
- Willems, R.J.L., ve Bonten, M.J.M., (2007), Glikopeptide dirençli Enterokoklar: virülans, direnç ve epidemiye ait özellikler, Current Opinion in Infectious Diseases, 2,3, s.181-187.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., (1990), "DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers", Nucleic Acids Research, Cilt 18, s.6531-6535.
- Yağcı, A., (2001), Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve polimeraz zincir reaksiyon (PZR) bazlı tiplendirme yöntemleri. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, s.149-60.
- Zaidi, N., Konstantinou, K., (2003), The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med*, 127, s.1098-105.