

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDRAR VE GAİTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECALIS VE *ENTEROCOCCUS FAECIUM*
SUŞLARININ ISI ŞOK PROTEİNLERİNİN
SDS-PAGE YÖNTEMİ İLE ANALİZİ**

Sevil ATEŞ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014-SBE-YL042 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2017

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDRAR VE GAİTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROCOCCUS FAECALIS VE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* SUŞLARININ
ISI ŞOK PROTEİNLERİNİN SDS-PAGE YÖNTEMİ İLE ANALİZİ**

Sevil ATEŞ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK

Üye
Prof. Dr. Ziya İLHAN

Üye (Danışman)
Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN

TEZ KABUL TARİHİ
27/01/2017

TEŞEKKÜR

Çalışmamda hoşgörü ve sabırlarını esirgemeyen, çalışmanın planlanması ve yürütülmesinin her aşamasında yardım ve önerileriyle büyük desteğini gördüğüm başta danışman hocam Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN olmak üzere, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Kemal GÜRTÜRK ve Prof. Dr. Ziya İLHAN'a, Arş. Gör. Özgül GÜLAYDIN'a, Yüksek Lisans dönem arkadaşım Gülşah TOLLU ve Samet KOLTAŞ'a, materyallerin toplanmasında destek sağlayan Van – Erciş Devlet Hastanesi personeline, çalışmalarım esnasında büyük fedakarlıklarda bulunan ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca, çalışmaya maddi destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Tablolar Listesi	VII
Şekiller Listesi	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enterokoklar ve Genel Özellikleri	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Etiyolojik özellikler	3
2.2. Bakterilerde stres	10
2.2.1. Bakterilerde stres proteinleri	10
2.2.2. Isı şok proteinleri (Heat Shock Protein - HSP)	12
2.2.3. Enterokoklarda ısı stresi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. İdrar ve gaita örnekleri	21
3.1.2. Bakteri izolatları	21
3.1.3. Referans suşlar	21
3.1.4. Besiyerleri	21
3.1.5. Çözeltiler ve test ortamları	21
3.1.6. SDS-PAGE yöntemi için kullanılan ayıraçlar ve çözeltiler	22
3.1.7. Elektroforez	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. İdrar ve gaita örneklerinin alınması	25
3.2.2. Bakteriyel izolasyon	25
3.2.3. İdentifikasyon	25
3.2.4. Isı stresi uygulamaları	27
3.2.5. Bakteri ekstraksiyonu	28

3.2.6. SDS-PAGE analizi	28
3.2.7. Elektroforetik protein bant profillerinin analizi	30
4. BULGULAR	31
4.1. Enterokok Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu	31
4.2. Enterokok İzolatlarının PCR ile İdentifikasyonu	31
4.3. Isı Stresi Uygulamaları	32
4.4. Elektroforetik Protein Bant Profillerinin Analizi	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51
EKLER	52
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	52
Ek 2. Hastane İzin Belgesi	53
Ek 3. Hasta Onam Formu	54
Ek 4. Tez Orijinallik Raporu	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ATCC** : American Type Culture Colection
- CLSI** : Clinical and Laboratory Standard Institute
- BHI** : Brain Heart Infusion
- HSP** : Isı Şok Protein
- sHSP** : Küçük Isı Şok Protein
- SDS PAGE** : Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	Şaperon aktivitesine sahip başlıca ısı şok proteinleri.....	18
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan tür spesifik primerler.....	27
Tablo 3.	Elektroforez işlemi için hazırlanan poliakrilamid jelde kullanılan çözeltiler.....	29
Tablo 4.	İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus faecalis</i> kültürlerinin dağılımı.....	31
Tablo 5.	İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen <i>Enterococcus faecium</i> kültürlerinin dağılımı.....	31
Tablo 6.	<i>Enterococcus faecalis</i> suşlarında tespit edilen protein molekülleri.....	33
Tablo 7.	<i>Enterococcus faecium</i> suşlarında tespit edilen protein molekülleri.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Isı şok operonlar arasında korunmuş ters tekrarlar (IR, CIRCE)	13
Şekil 2.	Bakteriyel ısı şok yanıtı: Büyük şaperonların kodlanması için operonların düzenlenmesi	13
Şekil 3.	Stres cevabında ısı şok proteinler (HSP) ve şaperon ağı	16
Şekil 4.	Isı şok proteinlerin genlerinin ısı şok faktörü ile transkripsiyonunun düzenlenmesi	17
Şekil 5.	Enterokokların multipleks PCR yöntemi ile analizlerinin agaroz jel görüntüsü.....	32
Şekil 6.	<i>Enterococcus faecalis</i> referans kültürünün 30 sn, 5 dk, 10 dk, 15dk, 20 dk. ve 30 dk süreyle 42 ve 45°C’lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları	35
Şekil 7.	<i>Enterococcus faecalis</i> referans kültürünün 30 sn, 5 dk, 10 dk, 15dk, 20 dk ve 30 dk süreyle 48 ve 50°C’lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları	35
Şekil 8.	<i>Enterococcus faecium</i> referans kültürünün 30 sn, 5 dk, 10 dk, 15dk, 20 dk ve 30 dk süreyle 42 ve 45°C’lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları	36
Şekil 9.	<i>Enterococcus faecium</i> referans kültürünün 30 sn, 5 dk, 10 dk, 15dk, 20 dk ve 30 dk süreyle 48 ve 50°C’lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları	36

1. GİRİŞ

İnsan ve birçok hayvan türünün gastrointestinal sistem florasında bulunan enterokoklar; ağız boşluğu, safra yolları ve genitoüriner sistemde de kolonize olmaktadır.

Enterococcus cinsi bakteriler 1984 yılından önce taksonomik olarak *Streptococcus* cinsi içerisinde yer almaktaydı. Bu grupta gaitadan izole edilen, laktoz ve mannitol pozitif fermentatif Gram pozitif koklar *Streptococcus faecalis* olarak adlandırılmıştır. 1940'lı yılların başında karbonhidrat fermentasyon sonuçlarına göre bu grupta olan ikinci bir fekal tür tanımlanmış ve *Streptococcus faecium* olarak adlandırılmıştır (Klein, 2003).

1984 yılına kadar Rebecca Lancefield tarafından D grubu streptokoklarda sınıflandırılan enterokoların, DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmalarının sonucunda streptokoklardan farklılıkları belirlenerek ayrı bir cins oldukları kabul edilmiştir (Murray, 1990).

Taksonomik ayırım sonrasında günümüze kadar 35 farklı enterokok türü tanımlanmıştır. Ama klinik olarak en önemli patojenlerin *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* olduğu bildirilmiştir. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80'inden bu iki mikroorganizmanın sorumlu olduğu saptanmış olup *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. avium* ve *E. flavescens*'inde daha az sıklıkla insanlarda enfeksiyon etkeni olduğu belirlenmiştir (Klein, 2003).

Enterokoklar bazı antibiyotiklere doğal dirençli oldukları ve yeni dirençler geliştirebilme yeteneğine sahip olduklarından, son yıllarda hastane enfeksiyonu etkenleri açısından da büyük önem kazanmışlardır (French, 2010). *E. faecalis* ile oluşan enfeksiyonların diğer enterokok türlerine oranla yaklaşık 10 kat fazladır. Son zamanlarda, vankomisine dirençli enterokok (VRE)'lar ön plana çıktığından bu oran gittikçe azalmış, birçok antibiyotiğe dirençli *E. faecium* suşları daha çok dikkat çekmeye başlamıştır (Başustaoglu ve Aydoğan, 2002).

Enterokokların çoğu sağlıklı insanların intestinal florasında bulunmasına rağmen, endokardit, bakteriyemi, üriner sistem enfeksiyonları ve neonatal sepsis gibi hastane enfeksiyonlarına neden etkeni olabilmektedir (Dutka–Malen ve ark., 1995). Hastane kaynaklı enfeksiyonlara en sık yol açan başlıca patojen bakteri gruplarından biri olan enterokoklarla meydana gelen enfeksiyonların mortalite oranının %61'lere ulaştığı bildirilmiştir (Fisher ve Phillips, 2009). Hastane enfeksiyonlarına en sık yol açan türler sırasıyla *E. faecalis* (%80-90) ve *E. faecium* (%5-10)'dur (Sood ve ark., 2008; Arias ve ark., 2010).

Bakteri, konakçı dışında olumsuz ısı, olumsuz pH düzeylerinde ve hatta bazı bakterisid etkili deterjanların varlığında bile aktivitesini koruyabilmektedir. Son yıllarda özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda bakterinin önemi giderek artmakta, hatta bazı olgularda nozokomiyal bakteriyemilerden ikinci frekansta sorumlu patojen olarak bildirilmektedir (Lautenbach ve ark., 1999; Patterson, 2000; Shepard ve Gilmore, 2002).

Isı stresi, bakterilerin üremesi üzerine olumsuz etkileri olan en önemli stres faktörlerinden biridir. Bakterilerde ısı şokuyla ilgili ilk çalışmalar *Escherichia coli* K-12 serotipi ile gerçekleştirilmiştir. Bu serotip, spesifik ısı şok proteinlerinin sentezinde kilit rol oynayan operonun promotör bölgesini tanıma özelliğinde olan σ^{32} 'ye sahiptir. Bu faktör, bir transkripsiyon aktivatörü olmakla birlikte bakteri sitoplazmasındaki ömrü oldukça kısadır. Diğer taraftan çeşitli şok proteinlerinin sentezi, sıcaklığın yanında diğer çevresel koşulların değişmesiyle de indüklenebilmektedir. Bu proteinlerin içerisindeki bir grubun sentezi sadece ısı ile indüklendiğinden, bu tip proteinlere doğrudan ısı şok proteinleri (Heat Shock Protein - HSP) adı verilmektedir (Segal ve Ron, 1998).

Bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde ısı stresi uygulamaları sonrası oluşan ısı şok proteinleri iki yönlü jel elektroforezi kullanılarak ayrıntılı bir şekilde ortaya konulmuştur (Üzümcü, 2009). İmmunodominant antijenler olarak bilinen HSP'ler, otoimmün tepkilerin güçlü bir şekilde uyarılmasına da neden olurlar (Zügel ve Kaufmann, 1999).

Bu araştırmada idrar ve gaita örneklerinden izole ve tanımlanmış *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları kademeli ve direkt ısı uygulamaları ile strese maruz bırakıldı. İzolatların bu ısı stresi, ortamlarının olumsuz etkilerine karşı kendilerini korumak amacıyla stres proteini sentezleyip sentezlemediği SDS-PAGE yöntemi ile araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterokoklar ve Genel Özellikleri

2.1.1. Tarihçe

Önceleri “fekal orijinli streptokoklar” olarak adlandırılan, günümüzde “enterokoklar” olarak adlandırılmışlardır. Enterokok terimi, Fransa’da yayımlanan bir makalede ilk kez Thiercelin (1899) tarafından “insan gaitasında çiftler veya kısa zincir formundaki bakterileri” tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Enterokoklar, 1930’larda Rebecca Lancefield tarafından yapılan serolojik sınıflandırmada grup D streptokoklar arasında klasifiye etmiş, Sherman ise ilk kez 1937 yılında enterokok grubu bakterileri tanımlamıştır (Akan, 2004).

Kalina (1970), morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre fekal streptokokların yeni bir cins içinde değerlendirilmesini ve *S. faecalis* ile *S. faecium*’un *E. faecalis* ve *E. faecium* olarak adlandırılmasını önermiştir. Ancak enterokoklar uzun süre grup D streptokoklar olarak *Streptococcus* cinsi içerisinde değerlendirilmiştir. Schleifer ve Klipper (1987), *S. faecium* ve *S. faecalis*’in bilinen streptokoklardan farklı olduklarını iddia etmiş ve bu bakterilerin *Streptococcus* cinsinden ayrılarak *Enterococcus* adı ile yeni bir cins şeklinde kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Gram pozitif kokların DNA-RNA hibridizasyonları, 16S-rRNA dizilerinin analizi ve hücre duvar yapılarının incelenmesi ile yapılan sınıflandırma çalışmaları sonucunda; *Streptococcaceae* familyası 1991 yılında öne sürülüp daha sonra da modifiye edilerek *Streptococcus*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* cinsi olarak 3 alt cinse ayrılmıştır (Bilström, 2008).

2.1.2. Etiyolojik özellikler

2.1.2.1. Enterokokların morfolojik ve kimyasal özellikleri

Enterokoklar Gram pozitif, tek tek, ikili veya kısa zincirler şeklinde görülen, 0.5– 1.5 mm çapında, gri-beyaz renkli ve buğulu görünümde koloniler oluşturan, alfa, beta hemolitik ya da non-hemolitik fakültatif anaerob bakterilerdir. Sıvı besiyerlerinde

bulanıklık yapmaksızın dipte çöküntü oluşturarak ürerler. Bazen kokobasil şeklinde de görülebilen enterokokların sıvı besiyerlerinde üretildiğinde uzun zincirli formları gözlenebilmektedir. Katalaz negatiftirler ve glikozdan gaz oluşturmazlar. Sitokrom oksidaz enzimine sahip olmadıklarından karbonhidratları heksoz difosfat yoluyla hidrolize etmektedirler. Bazı durumlarda özellikle *E. faecalis*, ilk izolasyonu katalaz negatif iken seri pasajlarda ‘pseudo catalase’ yapımı sonucu katalaz testinde zayıf bir pozitiflik gösterebilmektedir (Ruoff ve ark., 1990; Teixeira ve Facklam 2003).

Enterokoklar 10-45°C’ler arasında üreyebilen, %6.5 NaCl’li ortamlarda bile aktivitesini koruyan, 60°C’de 30 dk. süreyle canlı kalabilen bakterilerdir. Bile esculine agarda, pH 9.6’da ve %40 safra tuzu içeren besiyerinde rahatlıkla üreyebilirler. *E. cecorum*, *E. saccharolyticus* ve *E. columbae* dışındaki tüm türler pirolidonil betanaftilamid (PYR) pozitifler. *E. faecium*, *E. faecalis*’dan farklı olarak %0.04 tellüritli ortamda ürer ve katı besi yerinde siyah renkte koloniler oluşturur. *E. flavescens* ve *E. casseliflavus* gibi bazı türleri hareketlidir. Bu kültürel özellikler enterokokların identifikasyonunda yeterli ise de daha az rastlanan Gram pozitif, katalaz negatif koklardan *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* gibi türlerde de benzer özellikler bulunmaktadır. Ancak *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türlerinin PYR negatif olmaları, *Aerococcus* ve *Lactococcus* ve türlerinin de serogrup D antiserumu ile de reaksiyonun negatif olması enterokoklardan ayıran özellikleridir (Facklam ve Sahm, 1995; Teixeira ve Facklam, 2003).

2.1.2.2. Enterokokların virulens ve patojenite faktörleri

Virulensleri düşük olmalarına karşın enterokoklar, popülasyon kaynaklı ve özellikle hastane orijinli enfeksiyonlarda tespit edilen önemli etkenler arasındadır. İnsan ve hayvan eritrositleri için hemolizin etkili olan sitolizin, bazı *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları tarafından sentezlenmektedir. *E. faecium* ve *E. faecalis* suşları agregasyon maddesi sentezlemekte ve bakterinin kalp kapakları ile renal hücrelere bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Öte yandan *E. faecalis* biyofilm oluşturarak üriner sistem, kateterler ve kalp kapaklarına bağlanmasını sağlamaktadır (Moellering, 2005).

Enterokoklar birçok antimikrobiyel ajana dirençli olduğundan, antibiyotik tedavisi gören hastalarda varlıklarını sürdürebilmekte ve superinfeksiyonlara neden olabilmektedir (Robert ve Moellering, 2000).

Yapılan çalışmalarda enterokokal bakteriyemilerde mortalite oranı %42-68 olarak bildirilmiştir. Ancak hastaların yaşlı olmaları ve çoğunda multifaktoriyel bakteriyemi tespit edilmesi nedeniyle, etkenin mortalitedeki rolü tam olarak tespit edilememiştir (Edmond ve ark., 1995). Diğer bazı çalışmalarda da enterokokların mortalite oranları %31-37 olarak bildirilmiştir. Bu oranlar arasındaki farklılıkların yöresel farklılıklar olabileceği düşünülebilir (Kreft ve ark., 1992; Edmond ve ark., 1996).

Enterokokların bilinen virülens faktörleri şu şekilde sıralanabilir

Sitolizin: Bazı *E. faecalis* ve *E. faecium*'un suşlarınca üretilmekte olup eritrositler için litik aktivite gösterir. *E. faecalis* suşlarının %60'ının sentezlediği bu virülens faktörü bazı ökaryotik hücreler için de toksik etki gösterir (Moellering, 1992). Toksinin insan ve at kanının kullanıldığı kanlı agarlarda hemolitik aktivite gösterirken, koyun eritrositlerinde etkisiz kalması identifikasyon açısından önemli bir özelliktir (Gültekin, 2004).

Jelatinaz: Jelatinaz enzimi özellikle kasların kemiklerle olan bağlantı bölgeleri ve deri gibi dokularda bulunabilen jelatini lize etmesi bakımından bakterinin invazyonunda etkili bir virülens faktörüdür. Yapılan bazı çalışmalarda, *E. faecalis* suşları arasında jelatinaz sentezleyenlerin akut toksik etkilerinin diğer suşlara nazaran daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Gültekin, 2004)

Agregasyon faktörü: Birçok *E. faecalis* ve *E. faecium* suşunda bulunan bir yüzey proteindir. Konjugasyonda iki bakterinin birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırır. Agregasyon faktörü, enterokoklarda kalp kapaklarına bağlanarak endokarditin ve böbrek epitel hücrelerine bağlanarak da üriner sistem infeksiyonunun oluşumunda oldukça önemli bir role sahiptir. Özellikle *E. faecalis* suşlarının kateter kullanımına bağlı üriner sistem infeksiyonlarında, agregasyon

faktöründen dolayı daha yüksek oranda izole edildikleri tespit edilmiştir (Moellering,1992; Gültekin, 2004).

Feromonlar: *E. faecalis*'ler tarafından sentezlenen küçük peptitlerdir. Suşlar arasında plazmid DNA'sının konjugatif transferini kolaylaştırır. Nötrofiller için kemotaktik bir etki gösterdiği için infeksiyonlarda inflamatuvar yanıtın artmasına neden olmaktadır (Koneman ve ark., 2005).

Ekstraselüler süperoksit: *E. faecalis* suşlarının büyük çoğunluğunda gözlenen ve bakterinin yaşam süresini uzattığı tespit edilen süperoksitin, bazı *E. Faecium* suşları tarafından da sentezlendiği belirlenmiştir (Gültekin, 2004).

Ekstraselüler yüzey proteini: Kompleks bir yapısı bulunan bu büyük yüzey proteini ilk kez *E. faecalis* türlerinde tespit edilmiştir. Proteinin karboksil ucu konakçının hücre duvarı moleküllerine tutunmayı kolaylaştırır. Proteinin iç kısmında bulunan, tekrarlayan ünitelerden zengin ve uzayıp kısalabilme özelliğinde bir başka bölgenin de bakterinin immun yanıtın kaçmasına katkı sağladığı düşünülmektedir (Sood ve ark., 2008).

Kapsüler polisakkarit antijeni: Enterokokların hücre yüzeyinde yer alan bu polisakkarit antijeni, β -D glikoz mono fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan kompleksinden oluşur. Zeta potansiyeli etkisinden dolayı opsonik antikorlar için öncelikli hedef teşkil etmesi, enterokok virulensinin yanısıra infeksiyonlarına karşı immunitede özel bir rolü vardır ve aşı çalışmalarında kullanılabilirliği halen araştırılmaktadır (Gültekin, 2004).

Lipoteikoik asit: Enterokokların Lancefield tarafından tanımlanan streptokokal serogrup antijenlerinden olan C polisakkarit olarak da adlandırılan serogrup D spesifik antijenini oluşturur. TNF ve IFN salınımına neden olarak, immun yanıtın düzenlenmesine katkı sağlar (Koneman ve ark., 2005).

Antibiyotik direnci: Virulens faktörleri arasında değerlendirilen antibiyotik direnci, enterokok suşlarının bağırsak florasında üremesini; jelatinaz ve sitolitik toksin de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır. Nozokomiyal enterokok infeksiyonlarında hastanın yatışından kısa bir süre sonra antibiyotik kullanımına bağlı olarak duyarlı

suşlar inaktive olmaktadır. Ancak bağırsak florasında bulunan ve antibiyotiklere dirençli olan suşların ise sayıları artmakta ve hastaların bir kısmında sindirim sistemi florasından kaynaklanan doku invazyonlarına rastlanılmaktadır (Gültekin, 2004).

Enterokoklar yarı sentetik penisilinlere (ör; oksasilin), vankomisine (*E. gallinarum*, *E. flavescens* ve *E. casseliflavus* gibi bazı türler düşük seviyede), polimiksinlere, streptogramin A, likosamidlere, aminoglikozidlere (düşük seviyede) ve monobaktamlara karşı dirençlidirler (Poeta ve ark., 2005).

2.1.2.3. Enterokokların epidemiyolojik özellikleri

İnsanlarda normal sindirim sistemi florasında bulunmaları nedeni ile birçok ortamda endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. Enterokoklar sıcakkanlı hayvanların ve insanların sindirim sisteminde, dışkı kontamine bitki, böcek, su, toprak ve besinlerde de bulunur. Bu bakımdan içilen veya kullanılan suların fekal kontaminasyonlarının tespitinde indikatör bakteri niteliğinde belirleyicidir. İnsanların dışkılarında *E. faecalis* (10^5 - 10^7 cfu/gr), *E. faecium*'dan (10^4 - 10^5 cfu/gr) daha yaygın bulunurken, hastane ortamında antibiyotiklere dirençliliğinden dolayı *E. faecium* daha ön plana çıkar (Fisher ve Phillips, 2009; Hijazi ve ark., 2009).

Enterokok enfeksiyonları arasında *E. faecalis* orijinli enfeksiyonların oranı diğer suşlara oranla 10 kat daha fazla iken son 20 yıldır VRE izolatlarının artmasıyla bu oran giderek azalmış ve *E. faecium* izolatları daha ön plana çıkmıştır (Başustaoğlu ve Aydoğan, 2002).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, enterokokların normal barsak florasında bulunmasının hastadan hastaya ve hatta hastaneler arası yayılabilmesinde temel risk faktörü olduğunu göstermiştir (Butler, 2006). Zaman geçtikçe enterokokların antibiyotik direncinin epidemiyolojisi de değişmiştir. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSS)'ın 2001 verilerine göre 841 kan izolatının %71'i aminopenisilinlere dirençli olarak bildirilmiştir. Direnç oranı İrlanda için %40, Avusturya için ise %86 olarak bildirilmiştir (Cox ve ark. 2009). Ampisilin dirençli *E. faecium* suşlarının artışı oldukça dramatik bir hal almıştır. Ampisilin dirençli *E. faecium* suşlarında plazmid aracılı yüksek düzeyde glikopeptid direnci ilk kez 1988'de

bildirilmiştir (LeClerq ve ark.; 1988, Uttley ve ark.;1988). ABD’de 1995-2002 yılları arasında izolatlar glikopeptid direnci açısından değerlendirilmiş ve *E. faecalis*’e oranla *E. faecium* suşlarında daha belirgin bir direnç artışı şekillendiği tespit edilmiştir (Rudy ve ark., 2005). Türkiye’de ilk olarak 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi hastanesinde yapılan bir çalışmada Vural ve ark. (1999) tarafından vankomisine dirençli *E. faecium* suşu bildirilmiştir. Bu suşun, bronkopulmoner infeksiyonlu 11 aylık bir çocuktan, 15 gün arayla alınan iki farklı pleura sıvısından izole edildiği ve suşta gentamisin direncinin yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (Vural ve ark., 1999).

2.1.2.4. Enterokokların neden olduğu infeksiyonlar

Bakteriyemi: Enterokokal bakteriyemi enterokokal endokarditisten daha fazla görülen bir enfeksiyon olup sıklığı giderek artmaktadır. Polimikrobiyal bakteriyemilerde en sık rastlanan Gram pozitif bakteriler enterokoklardır. Olguların çoğunda üriner veya intravasküler kateter uygulaması bulunduğu için, kateterler biliyer, pelvik veya intraabdominal yara infeksiyonları da esas kaynak teşkil etmektedir. Solunum yollarında ise enterokokal bakteriyemiye nadiren rastlanır (Korten, 2002). Bakteriyemiye bağlı mortalite oranını değerlendirmek oldukça zordur. Çünkü vakaların çoğunda sekonder etken olarak yer aldıkları için enterokokların mortalitenin ne kadarından sorumlu oldukları belirlenememektedir. Ancak bu tür olgularda enterokokların vakaya katılmasından sonra mortalite oranının %50’nin üzerine çıktığı bilinmektedir (Esen, 2004).

Üriner sistem enfeksiyonları: Üriner sistem enfeksiyonları, enterokokların en sık izole edildiği enfeksiyonlardır. Özellikle üriner anomalili kişilerde enfeksiyon etkeni olarak daha yüksek oranda tespit edilmektedirler (Honkinen ve ark.;1999, Bitsori ve ark.; 2005). Hemolitik özelliği bulunan enterokokların böbreklerde infeksiyona neden olma oranı diğer suşlardan daha yüksektir (Gültekin, 2004). Yatan hastalardaki kateterizasyon ve diğer üriner sistem girişimleri, özellikle başta sefalosporinler olmak üzere daha önceki antibiyotik kullanımları ve genitoüriner enfeksiyonlar en önemli risk faktörleridir (Kaye, 1982).

Karın içi enfeksiyonlar: Intraabdominal sistemlerin anaerop ve aerop florası içinde enterokoklar da bulunmaktadır. Siroz veya nefrotik sendromlu hastalarda,

bakteriyel peritonitli ve periton diyalizi yapılanlarda da sonradan bulaşarak peritonitise neden olurlar. Bazen abdominal cerrahi veya travma komplikasyonlarında enterokokal peritonitlerde primer etken olarak rastlanabilir. Enterokoklar ayrıca endometritis, sectio veya akut salpingitis komplikasyonu olarak bakteriyemi ve abse yapabilirler (Kaye, 1982). Ayrıca salpingitis ve endometritis gibi peripartum maternal infeksiyonlar ve sezeryan sonrası infeksiyonlarda da primer etken olabildiği belirlenmiştir (Yıldırım, 2007).

Endokardit: Stafilokoklar ve streptokoklardan sonra endokarditin üçüncü sıklıktaki etkeninin enterokoklar olmasının yanısıra, endokardit enterokokkal bakteriyeminin nadir bir komplikasyonu olarak görülmektedir (Ferrieri ve ark. 2002; Baddour ve ark. 2005). Hastalık, iatrojenik olarak bakterinin çoğunlukla genitoüriner sistem veya gastro-intestinal sistemden bulaştırılması ile endokardit şeklinde başlar. Ayrıca periyodik intravenöz ilaç uygulaması yapılan bireylerde de %5-53 oranında enterokokal endokardit görüldüğü belirlenmiştir. Olguların çoğunda altta yatan bir kapak hastalığı veya prostetik kapak bulunmakla beraber, enterokokların normal kapaklarda da infeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir (Yıldırım, 2007).

Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları: Nadiren yumuşak doku veya selulit infeksiyonlarına neden olurlar. Enterokoklar genellikle polimikrobiyal nitelikteki yanık yaraları ve cerrahi yaralar, diyabetik ayak ve dekubit ülserlerinin infeksiyonlarından izole edilmektedir (Moellering, 1981; Kreft ve ark. 1992).

Menenjit: Enterokokların neden olduğu menenjit genellikle merkezi sinir sisteminde oluşan bir anatomik defekt, daha önceden geçirilmiş beyin operasyonu ya da kafa travması gibi predispozisyonlarda görülür (Korten, 2002; Moellering, 2005). Ayrıca yüksek düzeyli bakteriyemi ile seyreden neonatal sepsis ve endokarditli hastalarla, AIDS ve akut lösemi gibi immun sistemi baskılanan hastalarda da kimi zaman enterokoklara bağlı menenjit olguları görülebilmektedir (Eroğlu ve ark., 2003).

Neonatal sepsis: Erken dönem neonatal sepsisin nadir etkeni olsa da, yeni doğan ünitelerinde salgın dönemlerinde daha yüksek oranlarda enterokok izole edilmektedir (McNeeley ve ark., 1996; Stoll, 2005). Neonatal enterokok enfeksiyonlarında etkilenen bebeklerin küçük prematürel ve düşük doğum ağırlıklı

bebekler oldukları ve daha çok nozokomiyal salgınlarda görülmeye eğilimli oldukları bildirilmiştir (Boulanger ve ark., 1991; Christie ve ark., 1994).

2.2. Bakterilerde stres

Bilindiği üzere her bakteri türünde gıda, ısı ve atmosferik ortam açısından farklı optimal koşullar bulunmaktadır. Bu koşullarda meydana gelen değişiklikler bakterilerin strese girmesine neden olur. Oksijen azlığı, aşırı sıcaklık ve besin miktarındaki azalma gibi çeşitli çevresel stres faktörleri ile mikrobiyal üreme inhibe olabilmektedir. Bu nedenle bakteriler yaşam döngülerinin büyük bir kısmını stasyonel fazda geçirirler (Msadek, 1999; Dikici, 2009).

2.2.1. Bakterilerde stres proteinleri

Optimal koşullarda varlığını sürdüren bir bakteri, maruz bırakıldığı ilk strese karşı duyarlı durumdadır. Böyle bir stres karşısında genel olarak bakterilerin membran geçirgenliğinde soğuk şoku olarak da adlandırılan bazı değişimler, hücrenin protein yapılarında değişimler, ribozomal hasarlar ve olumsuz nükleik asit etkilenmeleri gibi bakterinin fonksiyonlarını olumsuz etkileyen bazı değişiklikler ortaya çıkabilmektedir. Moleküler açıdan da bakteri hücresinde şok düzenleyici protein sentezi gerçekleşebilmektedir. Bakteri sentezlenen bu tür proteinler ile maruz kaldığı stres sonucu meydana gelen olası hasarı onarabilen, hücrenin varlığını devam ettirebilen veya stres faktörlerini etkisiz hale getirebilen bir düzeye ulaşabilmektedir (Yousef ve Courtney, 2003).

Ortamdaki olumsuz değişimlere adaptasyonun hızlı bir şekilde sağlanabilmesi için sentezlenen stres proteinleri iki büyük sınıf altında toplanmaktadır.

I. Stres tipine spesifik proteinler,

II. Alternatif sigma faktöre (σ^B) bağlı olarak sentezlenen genel stres proteinleri

Stres proteinleri protein katlanmalarında yeni sentezlenen proteinleri içermeleri yanında en öncelikli görevleri, katlanma yapan proteinlerin rastgele toplanmalarını engellemektir. Proteinlerin orijinal formunu koruyucu protektif moleküller olan

şaperonlar, stres etkisi ile hasara uğramış proteinleri ATP ve diğer kofaktörlerin de katkısıyla onarırlar (Jakob ve ark., 1993).

Moleküler şaperonlar hücreler tarafından sentezlenen proteinlerin bir sınıfı olup korunaklı hücrel moleküllerdir. Organizmanın olumsuz koşullarda varlığını sürdürebilmesini sağlamaktadırlar. Moleküler şaperonlar arasında *E. coli*'de de belirlenen ve stres proteinleri olarak adlandırılan GroEL, GroES, DnaK, DnaJ ve GrpE şeklinde moleküller bulunmaktadır (Fenton ve Horwich, 1997). Farklı tanımlanmış birçok protein olmasına karşın bunlar yaygın olarak HSP olarak adlandırılmışlardır (Üzümcü, 2009).

Strese durumlarında bakterilerde, şok yanıt veya uzun süreli adaptasyonlar şeklinde yanıtlar oluşmaktadır. Bu tür yanıtlar stres proteinleri aracılığı ile oluşmaktadır. Öte yandan bazı özel streslere karşı korunmada genel stres yanıtları yardımcı olabildiği gibi, çapraz olarak çoğu stresöre karşı koruma da sağlayabilmektedir. Bu durum çoğu stres yanıtlarının oluşumu açısından gerekli proteinlerin benzerliğinden kaynaklanmaktadır (Arsene ve ark., 2000; Neidhardt ve VanBogelen, 2000; Cronan, 2002; Yousef ve Courtney, 2003).

Bir bakteri herhangi bir stres faktörüne maruz kaldığında genetik kodunda direnç mekanizması olduğu takdirde, ilgili stres proteinlerini sentezleyerek korunmaya çalışır. Maruz kalınan stres sonrası transkripsiyon ile oluşan mRNA ribozomlarda transle edilerek sözkonusu stresten korunmada etkin düzenleyici şok proteinini sentezlemektedir. Stres proteini, bakteri fizyolojisini de etkileyerek maruz kalınan stres ile bakterinin mücadele etmesini sağlar. Sentezlenen bir protein sadece bir stres faktörü için etkili olabildiği gibi daha fazla stresöre karşı da etki gösterebilir. Ayrıca bakterilerin herhangi bir strese karşı geliştirdiği direnç mekanizması aynı olabildiği gibi zaman zaman farklı da olabilir. Hatta farklı gelişim evrelerindeki (lag faz, log faz ve stationer faz gibi) bir bakterinin aynı strese karşı geliştirdiği direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (Arsene ve ark., 2000; Neidhardt ve VanBogelen, 2000; Cronan, 2002; Yousef ve Courtney, 2003).

Bakterilerde farklı stres faktörleri ile genel stres yanıtı aktive edilebildiği gibi multiple stres faktörleri tarafından da uyarılabilir. Genel stres yanıtının uyarılması,

genellikle gelişmede yavaşlama veya stationer faza geçiş aşamasında gerçekleşir (Arsene ve ark., 2000). *E. coli* ve diğer Gram negatif bakterilerde bilinen stres yanıt sistemleri, alternatif sigma faktör (σ^S) tarafından kontrol edilir. Gram pozitif bakterilerde ise bu sistem σ^B tarafından kontrol edilmektedir. Sigma faktör ile σ^B tarafından uyarılan genlerin, bakteride osmoprotektan alımı ve DNA onarımını sağladığı ve böylelikle oksidatif ve ozmotik stres faktörlerince hücreyi hazırladığı belirlenmiştir (Hecker ve ark., 1996; Cronan, 2002).

2.2.2. Isı şok proteinleri (Heat Shock Protein - HSP)

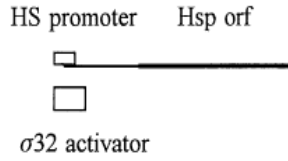
Bu tür proteinler değişik stres şartlarında sentezlenmektedir. HSP, bakterinin diğer protein yapıları için moleküler şaperon gibi davranır. Bu proteinlerin tanımlaması da moleküler ağırlıkları baz alınarak yapılmaktadır (HSP 60, HSP 70 ve HSP 90 vb). HSP'ler, organizmanın optimal üreme sıcaklığı dışındaki düşük ve yüksek sıcaklıklara maruz kalması sonucu sentezlenen sitoplazmik orijinli proteinlerdir. Bu gruptaki proteinlerin birçok önemli görevi olduğu belirlenmiştir. Proteinlerin düzenlenmesi, katlanması ve uygun olmayanların hücrede birikiminin önlenmesi örnek olarak verilebilir. Birçok şaperon, aynı zamanda HSP olarak adlandırılır. Bunun nedeni, bu moleküllerin fonksiyonlarını yüksek ısılarda bile gerçekleştirebilmeleridir. Aşırı sıcaklık, normalde şaperonlar olmadığı takdirde proteinlerde istenmeyen katlanmalar oluşmasına neden olur. Bu nedenle protein moleküllerinin yüksek ısılarda sağlıklı katlanma yapabilmeleri için şaperonlara ihtiyaç duyarlar (Buchner ve ark., 1998).

Organizmalar ısı stresine (HSP) sentezini arttırarak yanıt vermektedir. Isının artması ile hücrelerde HSP'nin çoğuna ihtiyaç duyulur. Bu uyarılan proteinler arasında DnaJ ve DnaK, RNA polimeraz σ^{70} altbirim (rpoD), GroEs, GroEL, Lon proteaz ve Lysu yer alır. *E. coli*'de yaklaşık 50 farklı HSP tanımlanmıştır. Bu proteinler alternatif σ faktörleriyle ve iki bileşenli regülatör sistemler tarafından düzenlenen alt bölümlere ayrılabilir (Konkel ve ark.,1998).

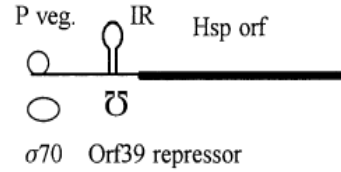
N N N
 N N
 N N
 N N
 CG
 TA
 CG
 AT
 CG
 GC
 AT
 TA
 TA

Şekil 1. Isı şok operonlar arasında korunmuş ters tekrarlıma (IR, CIRCE) (Segal ve Ron, 1998).

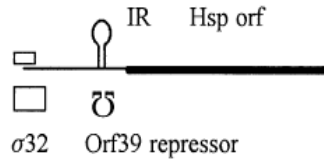
A. Transcriptional activation by σ_{32}



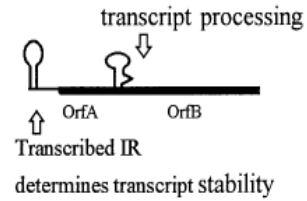
B. Repressor binding IR



C. σ_{32} + IR + repressor (or only σ_{32})



D. Post-transcriptional control



Şekil 2. Bakteriyel ısı şok yanıtı: Büyük şaperonların kodlanması için operonların düzenlenmesi (Segal ve Ron, 1998).

HSP genlerinin spesifik ekspresyonu, bu genlerin promoterlerini tanıyan ve transkripsiyonel aktivatörlerden etkilenen alternatif σ faktörleri ile düzenlenir. Bunlar Gram negatiflerde σ^{32} ve σ^E , Gram pozitiflerde σ^B 'dir. Transkripsiyonel represörlerden en çok rastlanılan HrcA'dır. HrcA, tersine tekrarlanan dizi olan ve ısı şok operonunda bulunan CIRCE'e bağlanır. HrcA-CIRCE tarafından kontrol edilen ısı şok operonu

Gram pozitiflerde vejetatif sigma faktörü σ^A ve Gram negatiflerde ısı şok sigma faktörü σ^{32} tarafından kontrol edilir (Rosen ve Ron, 2002).

σ^H regülasyonu ile sentezlenen protein sitoplazmayı termal strese karşı korur. *E. coli* rpoH gen lokusu ile 32 kDa σ faktörünü şifreler. Promotor RNA polimerazın spesifitesini yeniden yönlendiren faktörler σ^H veya σ^{32} olarak adlandırılır. σ^H 34 HSP'nin sentezlenmesini düzenler. Isı şokunun artması ile σ^H üretimi de artar. Bu prensip basit olmasına rağmen σ^H üretimini yöneten genetik mekanizmalar komplekstir. *E. coli*'de sıcaklığın 30 °C'den 40 °C'ye çıkması rpoH translasyonunun artması ile sonuçlanır. Cis-acting m-RNA bölgeleri rpoH mesajının 5' ucundaki ribozoma bağlı bölgeleri ayıran sıcaklığa duyarlı ikincil yapıları biçimlendirir. Yüksek sıcaklıklarda bu ikincil yapılar erir ve rpoH mesajının daha etkin translasyonunu sağlar. rpoH mesajının translasyonunun artmasına ilave olarak σ^H proteini daha stabil olur. 30°C'de büyüme süresince σ^H proteini, FtsH, HsIVU ve ClpAP'yi içeren birkaç proteaz tarafından parçalanabilir. Bununla birlikte, eğer σ^H RNA polimeraza bağlanırsa σ^H bu proteaz enziminden korunabilir. RNA polimerazdan σ^H 'yı ayıran hücreler düşük sıcaklıkta σ^H ile etkileşmek için DnaJ-DnaK-GrpE operon takımını kullanır. σ^H proteininin RNA polimeraza bağlanmaması, σ^H proteininin degradasyonunu ile sonuçlanır (Moat ve ark., 2002).

Isı şoku proteinleri, çeşitli özelliklerine göre gruplanmışlardır.

Bakterilerde üç farklı molekül ağırlıkta HSP; HSP90, HSP70 ve HSP60 bulunur. Ökaryotların sentezlediği önemli ısı şok proteinleri, birbirinden farklı yapısal özelliklere sahip altı grupta değerlendirilirler. HSP60, HSP70, HSP90 ve HSP100 proteinlerinin molekül ağırlığı ortalama 17-30 kDa arasında iken, ubiquitin gibi proteinler ise 8.5 kDa moleküler ağırlıktadırlar. Molekül ağırlıkları büyük olan HSP70, HSP90 ve HSP100 proteinlerinin sekansları, bitkiler ile yüksek oranlarda benzerlik göstermesine karşın spesifik fonksiyonlarında farklılık görülmektedir (Waters ve ark., 1996; Vierling, 1997).

2.2.2.1. Hücreyi strese karşı korumada etkili olan ısı şok proteinleri

HSP8: Hücre içi proteinlerin düzenlenmesini sağlamaktadırlar (Nollen ve ark., 1999).

HSP10: HSP60 ile birleşerek fonksiyonel hale geçer (Nollen ve ark., 1999).

HSP20: Birbirinden farklı HSP'lerle birleşerek fonksiyonel hale gelir. Bakterinin membran yapılarının organizasyonuna ısı ile oluşan stres koşullarında destek olurlar (Nollen ve ark., 1999).

HSP25, HSP27 ve HSP32: Molekül ağırlıkları 15-32 kDa arasında değişen bu HSP'ler sitoplazmada lokalize olarak apoptozisin düzenlenmesinde etkindirler (Nollen ve ark., 1999).

2.2.2.2. Protein katlanmasında görevli olan ısı şok proteinleri

HSP40: Büyük moleküllü şaperon grubuna dahil olup ökaryotlarda HSP70'in fonksiyonlarına katkı sağlar ve HSP70 ile benzer görevler üstlenir (Nollen ve ark., 1999).

HSP47: Serin proteaz enziminin aktivitesinde rol oynayan bu proteinin hücredeki miktarı fotofosforilasyon sırasında önemli düzeyde yükselir (Nollen ve ark., 1999).

HSP60: Özelliği ısı artışı ile bozulmuş proteinlerin yeniden fonksiyonel olmasını sağlayan bu protein, sitoplazmada bulunur ve 14 alt ünitelerden meydana gelir. HSP70 ile birlikte proteinin doğal katlanmasına aracılık yapar. Stresten korunma ve protein katlanması için gereklidir. Hatalı katlanan polipeptidlere bağlanarak doğru katlanmalarına yardımcı olmaktadır (Nollen ve ark., 1999).

2.2.2.3. Isı şoku yanıtlarının düzenlenmesinde etkili olan ısı şok proteinleri

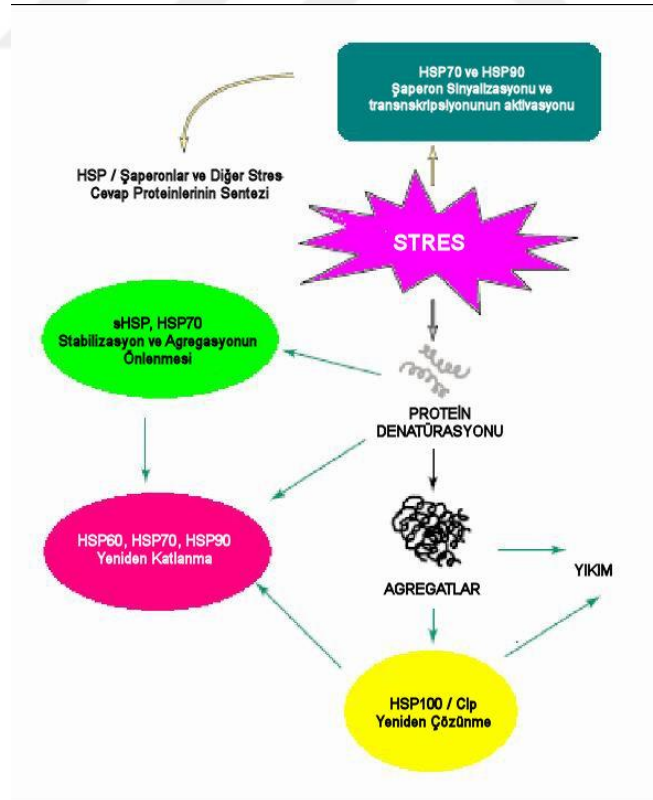
HSP70: Prokaryot ve ökaryotlarda farklı görevi bulunmaktadır. Hatalı katlanan protein moleküllerinin yapılarının düzeltilmesine yardımcı olur. Bu proteinlerin kimyasal, kuraklık, soğuk, ısı ve diğer çevresel indükleyiciler sentezlendikleri belirlenmiştir (Wang ve ark., 2004). Bakterilerde HSP70'te mutasyonun gerçekleşmesinin çoğunlukla bakterinin inaktivasyonu ile sonuçlandığı belirlenmiştir. HSP-70, kısmen denature olmuş ya da katlanmamış polipeptidlere bağlanır. Ökaryot ve prokaryotlardaki bazı HSP70 grubu proteinlerin fosforilasyona maruz kaldığı saptanmıştır (Nover ve ark., 1989).

2.2.2.4. Proteinlerin katlanması ve tespitinde görevli olan ısı şok proteinleri

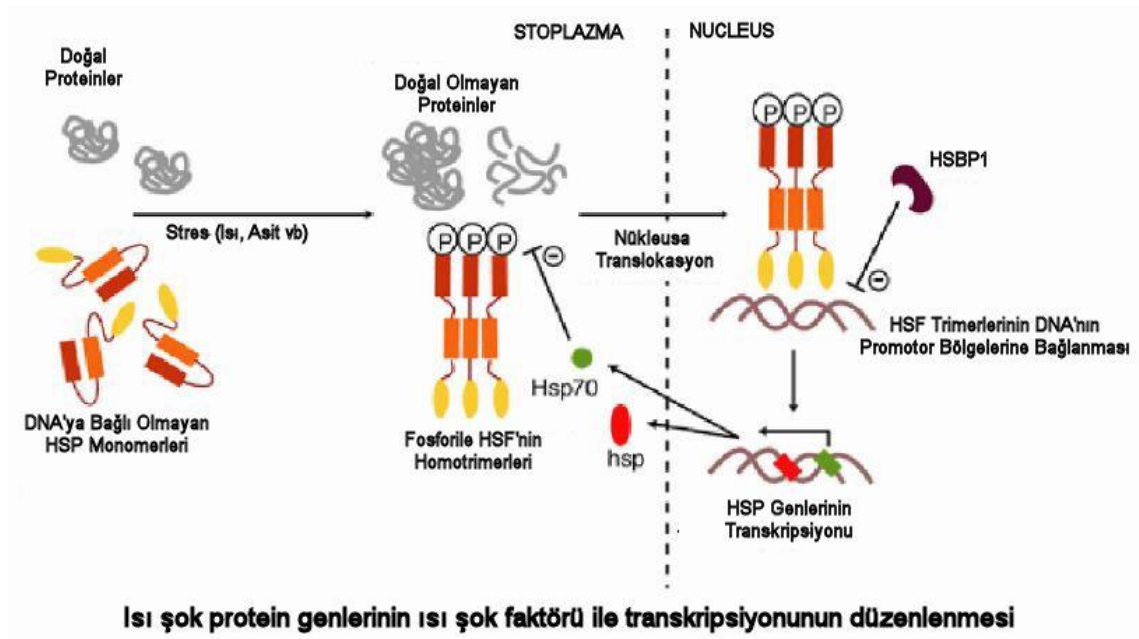
HSP90: Komplekslerin birleştirilmesini organize eder. Bu proteinler yüksek düzeyde korunmakta olup, başlıca görevleri katlanmaları gerçekleştirmektir (Lindquist ve Craig, 1988). Diğer yandan hücre içi iletişim ağında ve hücre döngüsünün kontrolünde, protein taşınmasında ve yıkımında da rol oynarlar. Birçok bakteride strese bağlı olarak artan bu proteinler total hücre proteininin %1-2'sini oluşturur. (Wang ve ark., 2004).

2.2.2.5. Termotoleranstan sorumlu olan ısı şok proteinleri

HSP100 ve HSP110: Hücre gelişiminde etkili olan bu proteinlerin stresöre bağlı olarak sentezlerinde artış görülmektedir. Daha çok proteinlerin denatüre olmasını önlemekte görev yaparlar (Wang ve ark., 2004). HSP104'ün mayalarda yüksek ısıya toleransta, HSP101'in ise *Arabidopsis*'te yüksek miktarda sentezlenmesiyle büyümeye katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Burke, 2001; Maestri ve ark., 2002; Vinocur ve Altman, 2005).



Şekil 3. Şaperon ağı ve stres cevabında ısı şok proteinleri (Wang ve ark., 2004)



Şekil 4. Isı şok proteinlerin genlerinin ısı şok faktörü ile transkripsiyonunun düzenlenmesi (Aşkar ve ark., 2007)

2.2.2.6. Küçük ısı şok proteinleri (sHSP)

sHSP'ler futbol topu görünümündedirler. sHSP monomer molekülü 15-40 kDA'luk kütleler halinde bulunur. Tüm sHSP'ler yaklaşık 100 kalıntı ve C ucunda hakim olan bir kristal veya ısı şok hakimiyeti ile belirtilir. Isı stresi görülen hücrelerde belirgin olarak artış gösterir. Ayrıca antioksidan özelliği vardır (Pockley, 2001). Memeli hücrelerinde, sHSP'lerin sadece strese karşı korunmada değil, aynı zamanda diğer hücre fonksiyonların (apoptozis ve farklılaşma gibi) modülasyonunda da görev aldığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2004).

2.2.2.7. Yüksek sıcaklık şoku proteinleri

Yüksek sıcaklıklarda oluşan stres, protein moleküllerinin arasındaki bağlarda bazı yapısal değişiklikler oluşturarak enzimatik aktivitelerini ve çözünebilirliklerini düşürmektedir. Isı artışı, bakteride non-kovalent bağların kırılmasına ve denatürasyona neden olabilmektedir (Buchner ve ark., 1998). Yüksek ısı proteinlerde geri dönüşümsüz bozulmalara neden olmakta ve bu durum proteinlerle hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır. Böylelikle, proteinlerin fonksiyonel yapıları korunmuş

olup, denatüre olmuş proteinlerin yeniden fonksiyonel duruma gelmesi, doğal proteinlerin çökmesinin engellenmesi ve varlıklarını sürdürebilmeleri bakımından çok önemlidir (Wang ve ark., 2004).

Tablo 1. Şaperon aktivitesine sahip başlıca ısı şok proteinleri (Schlesinger, 1990)

Prokaryotik proteinler	Ökaryotik proteinler	Yaklaşık moleküler ağırlık (kDa)	Fonksiyon
GroES	HSP10	10 kDa	
GrpE	HSP'nin HSPB grubu, Memelilerde HSP27 , HSPB6veya HSPB1'in de içinde bulunduğu 11 protein	20-30 kDa	
DnaJ	HSP40	40 kDa	HSP70'in ko-faktörü
GroEL	HSP60	60 kDa	Mitokondri veya kloroplasttan sentezlendikten sonra proteinlerin katlanmasında rol oynar
DnaK	HSP71 dahil HSP HSPA grup HSP70 , HSP72 , Grp78 (bip), Hsx70 sadece primatlarda bulunmuştur	70 kDa	Hücrenin ısı stresine maruz kalması durumunda proteinlerin katlanmasını veya açılmasını sağlayarak termotoleransı artırır. Ayrıca mitokondri veya kloroplastta translasyon sonrasında proteinlerin katlanmasını önler
HtpG, C62.5	HSP90, Grp94 dahil HSP HSPC grubu	90 kDa	Steroid reseptörlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin devamlılığının sağlanması
ClpB, CLPA, ClpX	HSP104, HSP110	100 kDa	Aşırı ısıya karşı tolerans

http://en.wikipedia.org/wiki/Heat_shock_protein#cite_note-MJS-7 'den alınmıştır.

Bu tip HSP'lerin bazıları optimum sıcaklıklarda hücrede sentezlenirken, birçoğunun sentezi yüksek sıcaklıkta gerçekleşmektedir. Diğer yandan, HSP'lerin biyosentezi, oksidatif stres, ağır metal, tuzluluk ve soğuk etkisinde kalma gibi faktörlerle de gerçekleşmektedir (Vierling, 1997; Simões-Araújo ve ark., 2003).

Yapılan genetik ve moleküler biyolojik araştırmalarda, stres ile uyarılan genlerin dzenlenmesinde çeşitli transkripsiyon faktörlerinin rol oynadığı tespit edilmiştir. Gen ekspresyonlarındaki bu tip farklılıkların, optimum üreme ısısından en az 5°C daha yüksek ısılarda gözleendiği bildirilmiştir (Bray ve ark., 2000; Uno ve ark., 2000; Sakuma ve ark., 2002; Doubuzet ve ark., 2003).

Yenidünya (2005) bazı *bacillus* türlerinin ısı şok proteinlerinin belirlenmesi konulu çalışmasında 48 ve 52°C'lik sıcaklıkuygulamalarının spor canlılığını önemli derecede düşürdüğünü ve SDS-PAGE analiz sonuçları farklı bakteri türlerinin ürettiği 39, 40 ve 42 kDa'lık proteinlerin yüksek sıcaklığa dayanıklılığı sağlayan farklı ısı şok proteinleri olduğunu ortaya koymuştur.

Cebrian ve ark. (2009) *S. aureus* ile yaptıkları çalışmada, ısıya dayanıklılıkta indüklenen σ^B 'nin rolünü araştırmışlardır. 45°C ısıda 5, 30 ve 120 dk. ısı şoku uygulamış ve 58°C ısıya termotolerans geliştiğini saptamışlardır.

Chiang ve ark. (2008) yaptıkları çalışmalarında *S. agalactiae*, *S. uberis* ve *S. bovis* suşlarını kullanarak ısı şoku protein genleri HSP70, HSP 40 ve HSP 10 tespit ederek bunlardan PCR primerleri tasarlamışlardır.

Spano ve ark. (2004) alışmalarında *Lactobacillus plantarum* suşuna sıcaklık, soğuk ve ethanol ile stres uygulamışlardır. Protein sekansı 18.548 kDa olarak hesaplanan, bu nedenle HSP 18.55 olarak adlandırılan protein ortaya koymuşlardır.

2.2.3. Enterokoklarda ısı stresi

Laport ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada *E. faecium* suşunun 42°C, 45°C, 48°C, 50°C, 52°C ve 55°C gibi farklı sıcaklıklarda 60 dk. süreyle ısı şok proteinlerini ve ısı direncine bağlı üreme durumlarını araştırmışlardır. Arttırılarak 70°C'ye getirilen ısıda 2 saat süreyle muamele sonrasında canlı kalabilen hücrelerin varolduğunu belirlemişlerdir. Western blotanalizi ile ısı kaynaklı proteinleri; GroEL (65kDa) ve DnaK (75kDa) olarak tespit etmişlerdir.

Boutibonnes ve ark. (1993)'nın *E. faecalis* üzerinde yaptıkları benzer bir çalışmada da 48 ile 94 kDa aralığında moleköl ağırlığına sahip ısı şok proteinlerinin varlığı ortaya konulmuştur.

Laport ve ark. (2005) başka bir çalışmalarında *E. faecium* suşuna 42°C ve 50°C de 10 dk. ısı muamelesi ve 37°C ısıda %6.5 NaCl veya %0.01 SDS veya 2.5 mM H₂O₂ ile 10 dk. muamelelerden sonra yanıt olarak DnaK ve groEL genlerinin indüksiyonu ortaya çıkmıştır.

Ahmad ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada *E. faecium* BAR1 ve *E. faecalis* MI2 suşlarına farklı ısı derecelerinde ve farklı sürelerde ısı işlemi uygulamışlardır. 37°C'de inkübe edilen bakteri suşlarının log faz hücre toleransını 55°C, 60°C, 62.5°C'lerde 3 dk. ısı işlemi uygulayarak oluşturmuşlardır. 50°C de 15 dk. ısı işlemi uygulayarak ısı şok proteinlerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, *E. faecium* BAR1 hücrelerinin 62.5°C'de 30 dk., *E. faecalis* MI2 hücrelerinin ise 62.5°C'de 20 dk. canlı kalabildiğini bildirmişlerdir.

Flahaut ve ark. (1997) ise *E. faecalis* suşu ile yaptıkları çalışmada, sıcaklık stresinin DnaK ve GroEL protein sentezinin artması arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sıcaklık dışında NaCl, etanol, SDS ve safra tuzları ile bakteriyi muamele etmişlerdir. 2-D jel Western blot analizi ile 50°C de 30 dk. ısı uygulanan bakterinin DnaK ve GroEL sentezlediğini tespit etmişlerdir, aynı zamanda sıcaklığın DnaK ve GroEL sentezinin en verimli indüktörü olduğunu bildirmişlerdir.

Rince ve ark. (2000) *E. faecalis* ATCC 19433 suşu üzerine sıcaklık ve çeşitli stres uygulamaları (etanol, safra tuzları, NaCl, H₂ O₂ ve pH değişimi) ile bakteri duyarlılığı ve kazanılan toleransı araştırmışlardır. 2-D elektroforezi yöntemi ile analiz neticesinde, bu çevresel streslere maruz kalma esnasında 167 stres proteini sentezlediğini saptamışlardır. Western blot analizi ile ikisi DnaK ve GroEL olmak üzere altı tane genel stres proteini tespit etmişlerdir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İdrar ve gaita örnekleri

Araştırmada materyal olarak Van-Erciş Devlet Hastanesi'nde yönetimin izni-onayı ile idrar yolu veya sindirim sistemi enfeksiyonu şüphesi ile hastanenin mikrobiyoloji laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen rutin idrar ve gaita örnekleri kullanıldı. Her bir örnek alımı için hastaların izni-onayı alındı.

3.1.2. Bakteri izolatları

Araştırmada incelenmek üzere alınan idrar ve gaita örneklerinden izole ve tanımlanmış olan 30'ar adet *E. faecalis* ve *E. faecium* suşu kullanıldı.

3.1.3. Referans suşlar

Çalışmada uygulanan identifikasyon ve SDS-PAGE yöntemlerinde kalite kontrol ve standart olarak *E. faecalis* ATCC® 29212, *E. faecalis* ATCC® 51299 ve *E. faecium* ATCC® 19434 referans suşları (MicroBiologics, MediMark Europe/Fransa) kullanıldı.

3.1.4. Besiyerleri

Örneklerden *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla blood agar base (Oxoid), bile esculin agar (Oxoid), tryptic soy agar (BD), brain heart infusion broth (Oxoid), todd hewitt broth (Oxoid) besiyerleri kullanıldı.

3.1.5. Çözeltiler ve test ortamları

HCl solüsyonları

1 N HCl: 8.28 ml HCl (%37), 91.72 ml steril distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

0.2 N HCl: 1.65 ml HCl (%37), 98.35 ml steril distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

NaOH solüsyonları

1 N NaOH: 4 gr NaOH, steril distile su içinde çözdürülüp 100 ml'ye tamamlandı.

0.1 N NaOH: 0.4 gr NaOH, steril distile su içinde çözdürülüp 100 ml'ye tamamlandı.

0.05 M Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.0 Çözeltisi

Bu amaçla 1 litrelik beher içine 8.76 gr NaCl (0.14 M) konulduktan sonra üzerine distile suda 8.9 gr çözdürülüp 1 lt'ye tamamlanan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 250 ml ve yine distile suda 6.8 gr çözdürülüp 1 lt'ye tamamlanan KH_2PO_4 çözeltisinden de 250 ml ilave edildi. Çözeltinin pH'sı $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve KH_2PO_4 çözeltilerinin uygun oranlarda bir litreye tamamlanacak şekilde karıştırılması ile pH metre cihazı (Mettler-Toledo MP230-U.K.) ile ölçülmek suretiyle 7.0'a ayarlandı. Hazırlanan PBS çözeltisi otoklavda sterilize edildi.

3.1.6. SDS-PAGE yöntemi için kullanılan ayıraçlar ve çözeltiler

Monomer sulüsyon (%30 T, %2.7 Cbis)

Acrylamide..... : 58.4 gr

Bis..... : 1.6 gr

Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı ve 4°C'de karanlıkta saklandı.

4x Ayırıcı jel buffer (1.5 M tris-Cl, pH:8.8)

Tris..... : 36.3 gr

Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı ve pH'sı HCl ile ayarlandı.

4x Dizici jel buffer (0.5 M tris-Cl, pH:6.8)

Tris..... : 3 gr

Distile su ile 50ml'ye tamamlandı ve pH'sı HCl ile ayarlandı.

%10 SDS (sodyum dodesil sülfat) solüsyonu

SDS : 50 gr

Distile su ile 500ml'ye tamamlandı.

Initiator (%10 amonyum persülfat,APS)

Amonyum persülfat..... : 0.5 gr

Distile su ile 5ml'ye tamamlandı.

Treatment buffer (0.125 M tris-Cl, %4 SDS, %20 glycerol, %10 2-mercaptoethanol)

Tris..... : 2.5ml (Tris-HCl-pH:8.8)

SDS(%10)..... : 4ml

Glycerol..... : 2ml

2-Mercaptoethanol..... : 1 ml

Distile su ile 10ml'ye tamamlandı pH 6.8'e ayarlandı.

Tank buffer (0.025 M tris, 0.192 M glycine,%10 SDS, pH:8.3)

Tris..... : 9.68 gr

SDS(%10)..... : 40 ml

Glycine : 57.6 gr

Distile su ile 4 L'ye tamamlandı.

Butanol solüsyonu:

n-Butanol..... : 50 ml

Distile su : 5 ml

Bir şişede karıştırılıp çalkalandı.

Boyama solüsyonu (%0.025 coomassie blue R-250,%40 methanol) / stain solution

Coomassie blue R-250..... : 0.5 gr
Methanol..... : 800 ml
Acetic acid : 140 ml

Distile su ile 2 L'ye tamamlandı.

Boya giderici solüsyon-I (%50 methanol,%10 asetik asit) / destain solution-I:

Methanol..... : 500 ml
Acetic acid : 100 ml

Distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Boya giderici solüsyon-II (%5 methanol,%7 asetik asit)) / destain solution-II:

Methanol..... : 50 ml
Acetic acid : 70 ml

Distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.1.7. Elektroferez

Çalışmada ısı şok proteinlerinin SDS-PAGE yöntemi ile analizlerinin yapılması içinYüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan dikey (vertikal) elektroferez cihazında (Thermo Owl® P8DS) hazırlanan jeller jel görüntüleme sisteminden genesis® yararlanılarak görüntülendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. İdrar ve gaita örneklerinin alınması

Erciş Devlet Hastanesi Yönetiminin izni-onayı ile hastanenin mikrobiyoloji laboratuvarına teşhis amacıyla getirilen rutin idrar örneklerinin 3-5 ml'si ve gaitanın da svap sürüntüsü hastaların onayı doğrultusunda kapaklı steril tüplere alınarak soğuk zincirde ve en kısa sürede YYÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına getirildi.

3.2.2. İzolasyon

E. faecalis ve *E. faecium* suşlarının izolasyonu için idrar ve gaita numunelerinden steril svap yardımı ile kanlı agar ve bile esculin agara ekimler yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 24-48 saat süreyle aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Üreyen S tipli eskulin pozitif siyah renkli koloniler değerlendirmeye alındı (Winn, 2006).

3.2.3. İdentifikasyon

Değerlendirmeye alınan izolatlar Gram yöntemi ile incelendi. Gram pozitif ve katalaz negatif zincir biçimindeki koklar *Enterococcus* spp. şüpheli olarak ayrıldı (Winn, 2006).

3.2.3.1. Katalaz testi

Temiz bir lam üzerine 1 damla %3'lük hidrojen peroksitten (H₂O₂) damlatıldı vetryptic soy agarda üretilen taze kültürdeki şüpheli bir koloni öze ile alınıp, H₂O₂ ilekarıştırıldı. Temas sonrası hava kabarcığının oluşması pozitif, oluşmaması negatif olarak kabul edildi (Arda ve ark., 1997; Aydın, 2004). Katalaz negatif kültürler *Enterococcus* spp. şüpheli olarak ayrıldı.

3.2.3.2. Enterokok izolatlarının PCR ile identifikasyonu

DNA izolasyonu: Testte pozitif kontrol amacıyla *E. faecalis* ATCC® 29212, *E. faecalis* ATCC® 51299 ve *E. faecium* ATCC® 19434 referans suşları kullanıldı. Pozitif

kontroller ve enterokok şüpheli olarak ayrılan 24 saatlik bakteri kültürleri DNA izolasyon kiti (Thermo GeneJET Genomic DNA Purification Kit – K0722 Litvanya) kullanılarak üretici firmanın Gram pozitif bakteriler için önerdiği protokolde DNA izolasyonları yapıldı. Bu amaçla 24 saatlik enterokok kültürlerinden FTS içinde mc farland 0.5 yoğunluğundaki süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyondan 1 ml alınarak ependorf tüplerine aktarıldı ve 5.000 x g'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pelet üzerine 180 µl lysis buffer (Gram pozitif bakteriler için protokolde belirtildiği şekilde hazırlandı) eklenerek iyice karıştırıldı ve 37°C'de 30 dk. bekletildi. Bakteri süspansiyonu üzerine kitte bulunan lysis solüsyondan 200 µl, proteinase K solüsyonundan da 20 µl eklendi ve iyice karıştırılarak homojenize edildi. Karışım belli aralıklarla karıştırılarak çalkalandı ve su banyosunda 56°C'de yaklaşık 30 dk. bekletilerek hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı. Çözelti üzerine kitte bulunan RNase A solüsyonundan 20 µl eklenerek, vortexlendi ve oda ısısında 10 dk. bekletildi. Üzerine 400 µl %50'lik etanol eklenerek iyice homojenize olması sağlandı. Karışımın tamamı içinde filtre bulunan koleksiyon tüplerine aktarılıp 6.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildikten sonra filtreler çıkarılarak yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Filtreli tüpün üzerine kitte bulunan ethanol ilave edilmiş wash buffer I'den 500 µl eklenerek 8000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi ve filtreler çıkarılarak tekrar yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. Üzerine wash buffer II'den 500 µl eklenerek, 12.000 x g'de 3 dk. santrifüj edildi ve filtreli tüpler steril ependorf tüplerine yerleştirildi. Filtreli tüplerin üzerine filtrenin tam ortasına gelecek şekilde elution buffer'dan 200 µl eklenerek oda ısısında 2 dk. beklendi ve 8.000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu şekilde izole edilen DNA alt tüplere aktarıldığından filtreler çıkarılarak atıldı.

Primer dizaynı: Primerler (Tablo 2) 16S ve/veya 23S rRNA genlerini kodlayan DNA'nın spesifik bölgeleri baz alınarak GenBank veritabanı ile doğrulanıp dizayn edildi. (Jackson ve ark., 2004). Multiplex PCR işlemleri, Kariyama ve ark. (2000) ile Jackson ve ark. (2004)'nın bildirdiği şekilde yapıldı.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan tür spesifik primerler

Bakteri Türü	Oligo	Amplikon uzunluğu (bp)
<i>E. faecalis</i>	F: 5'ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC 3' R: 5'TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG 3'	360
<i>E. faecium</i>	F: 5'GAA AAA ACA ATA GAA GAA TTA T 3' R: 5'TGC TTT TTT GAA TTC TTC TTT A 3'	215

Amplifikasyon: İzole edilen pozitif kontroller ve enterokok şüpheli DNA'ların *E. faecalis* ve *E. faecium* yönünden incelenmesi için tür spesifik primerler kullanılarak multiplex PCR tekniği uygulandı. Amplifikasyon aşaması için hazır ticari mastermixler (Thermo PCR Mastermix 2x – K0171 Litvanya) kullanıldı.

Karışım hazırlanırken; 25 µl'lik bir mastermix içine 2 µl incelenecek bakteri DNA'sı ve 1'er µM forward ve reverse primerler konulup karışım PCR grade water ile 50 µl'ye tamamlandı. Karışım ön denatürasyon için 96°C'de 10 dk. bekletildi. Daha sonra toplam 35 siklus gerçekleştirilen aşamada: 95°C'de 45 sn. denatürasyon, 49°C'de 45 sn. bağlanma, 72°C'de 60 sn. uzama ve final uzama için de 72°C'de 10 sn.'lik protokol uygulandı.

Agaroz jel elektroforez: Amplifikasyon aşamasının sonunda elde edilen ürünler pozitif kontroller ile birlikte %1'lik agaroz jelde koşturularak görüntüleme sisteminde (Genesis) incelendi. Oluşan bantlar değerlendirilirken örnekler arasında *E. faecalis* pozitif olan izolatların 360 bp, *E. faecium* pozitif olan izolatların ise 215 bp'lik bant oluşturup oluşturmadığı araştırıldı.

3.2.4. Isı stresi uygulamaları

Referans suşlar ile örneklerden izole ve identifiye edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarına farklı sürelerde farklı ısı uygulamaları yapılarak ısı stresi oluşturuldu. Bu amaçla her bir kültür 150 ml'lik BHI brotta üretildikten sonra 2000 x g'de 5 dk. santrifüj edildi ve üst sıvı atıldıktan sonra pelet iki seri halinde steril BHI ile

sulandırılıp McFarland no II (600×10^6 bakteri) yoğunluğuna getirildi. Bu yoğunluktaki bakteri süspansiyonlarının bir serisi üreme testine tabi tutuldu ve aktivitelerini korudukları teyit edildikten sonra ısı stresi uygulamaları yapıldı.

Isı stresi denemeleri öncelikle referans kültürlerde uygulandı. Referans kültürler üretilip 5'er ml olacak şekilde 40'ar adet porsiyonlandı. Kültürlerin her birinden her bir ısı uygulaması için 30 sn., 5 dk., 10 dk., 20 dk. ve 30 dk. uygulama sürelerinde kullanılmak üzere ayrı ayrı 5'er porsiyon kullanıldı. Bu şekilde referans kültürlerin her biri çalkalamalı su banyosunda 42°C, 45°C, 48°C ve 50°C'lik ısılarda ayrı ayrı 30 sn., 5 dk., 10 dk., 20 dk. ve 30 dk. bekletilirken; 52°C, 55°C ve 60°C'lik ısılarda ise ayrı ayrı 30 sn., 5 dk., 10 dk., 15 dk., 20 dk. ve 30 dk. tutuldu (Boutibonnes ve ark. 1993; Ahmad ve ark., 2002; Laport ve ark., 2003).

Referans suşlarda yapılan uygulamaların elektroforetik analiz sonuçlarına göre hangi ısı uygulamasının hangi sürelerde anlamlı sonuç verdiği değerlendirilerek izolatların maruz bırakılacağı ısılar ve uygulama süreleri belirlendi. Buna göre *E. faecalis* izolatları için 30 dk. süreyle 42°C ve 45°C; *E. faecium* suşları için ise 30 dk. süreyle 42°C ve 52°C ısı uygulamaları yapıldı.

3.2.5. Bakteri ekstraksiyonu

Isı stresine maruz bırakılan kültür süspansiyonları 2500 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet 0.05 M PBS ile sulandırılıp steril ependorf tüplere transfer edildikten sonra 10.000 x g'de, 10 dk. santrifüj edildi ve bu şekilde 2 defa yıkandı. Elde edilen bakteri peleti 50 µl treatment buffer (3.1.5'te belirtilmiştir) ile süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonu 100°C'de 3 dk. süreyle muamele edildikten sonra elde edilen ekstrakt elektroforez işlemlerinde kullanıldı (Laemmli, 1970; Diker ve ark., 2000).

3.2.6. SDS PAGE analizi

Elektroforez işlemi için aşağıda belirtilen çözeltiler ve miktarlar kullanılarak ayırıcı ve yığıcı poliakrilamid jeller (T %10, C %2.7) hazırlandı (Laemmli 1970).

Jellerin hazırlanmasında, önce ayırıcı jel karışımı, elektroforez setine yerleştirilen iki cam levha arasına döküldü ve üzerine 0.5 ml butanol solüsyonu ilave edilerek polimerize olması için 1-1.5 saat beklendi. Polimerize olan jelin üzerinden butanol solüsyonu dökülerek distile su ile üç kez yıkandı ve yığıma jel karışımı ilave edildi. Yığıma jelinin üzerine, cam levhalar arasına 12 gözlü tarak yerleştirildi. Yığıma jel'inin polimerize olması için 1-1.5 saat beklendikten sonra tarak çıkarıldı.

Tablo 3. Elektroforez işlemi için hazırlanan poliakrilamid jelde kullanılan çözeltiler

Kimyasal Madde	Ayırıcı jel (%10T)	Yığıma jeli (%4)
Acrylamide (%30)	20 ml	2.66 ml
Tris buffer (pH 8.8)	15 ml	-
Tris buffer (pH 6.8)	-	5 ml
SDS (%10)	0.6 ml	0.2 ml
Distile su	24.1 ml	12.2 ml
Ammonium persulfate	0.3 ml	0.1 ml
TEMED	0.02 ml	0.01 ml
Toplam miktar	60.02 ml	20.17 ml

Elektroforez işlemi için 2.2.5.'te hazırlanan ekstrakt 2.1.6.'da belirtilen numune buffer ile sulandırılıp bir damla brom fenol mavisi çözeltisi (izci boya) ilave edilerek elde edilen karışım 100°C'de 90 sn. muamele edildi. Oluşan kuyucuklara 200 µg protein olacak şekilde numuneler (5-20 µl) konuldu ve elektroforez işlemi 30 mA sabit akımla gerçekleştirildi. İzci boya jelin alt ucuna ulaşmaya kadar elektroforez işlemine devam edildi. Elektroforez işlemi bittikten sonra jel çıkarılıp 2.1.5.'te belirtilen boya çözeltisi içinde çalkalamak suretiyle 2-4 saat süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda boyanan jel I. boya giderici (destain-I) solüsyonda bir saat süreyle bekletildi ve daha sonra II. boya giderici solüsyon (destain-II) içinde çalkalamak suretiyle protein bantları belirli hale gelene kadar tutuldu ve aynı solüsyon içinde saklandı. Jeller, görüntüleme sisteminde (GeneLine ImageSCI Image Analysis System) fotoğraflanarak oluşan bantların analizi yapıldı.

3.2.7. Elektroforetik protein bant profillerinin analizi

Moleküler ağırlık tayini: Poliakrilamid jelde protein bantlarının moleküler ağırlığının tespitinde protein moleküler ağırlık standardı (Thermo, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa) kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra her bir standart proteinin relatif hareketi (R_f) aşağıda belirtildiği şekilde hesaplandı.

$R_f = \text{Jel başlangıcından protein bandına kadar olan mesafe} / \text{jel başlangıcından izci boyanın ulaştığı noktaya kadar olan mesafe}$

Molekül ağırlığının tespitinde kullanılan kalibrasyon eğrisi, söz konusu standart protein bantlarının R_f değerleri ile moleküler ağırlığı bilinen standart protein bantlarının \log_{10} değerleri kullanılarak aşağıdaki belirtilen formül yardımı ile hesaplandı ve NCSS bilgisayar programı ile kalibrasyon eğrisi elde edildi.

$$y = a + bx$$

$$a = \frac{\sum x^2 \cdot \sum y - \sum x \cdot \sum x \cdot y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n \cdot \sum x \cdot y - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$y =$ Bulunan a ve b değerlerine göre incelenen her bir protein bandının jel'deki molekül ağırlığının \log_{10} değeri.

$x =$ Her bir protein bandının relatif hareket değeri (Draper ve Smith, 1998).

4. BULGULAR

4.1. İdrar ve Gaita sÖrneklerinden Enterokok Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyonu

Alınan örnekler bilinen yöntemlerle 3.1.4'te belirtilen besiyerlerine ekim yapılarak 37°C'de 24-48 saat süreyle aerobik koşullardaki inkübe edildi. Kültürler değerlendirilirken, besi yerlerinde gözle görülebilir S tipli eskulin pozitif kahverengi-siyah renkli koloni oluşturan, Gram pozitif, tek tek, ikili veya zincir biçimindeki katalaz negatif koklar *Enterococcus* spp. şüpheli olarak değerlendirildi.

4.2. Enterokok İzolatlarının PCR ile İdentifikasyonu

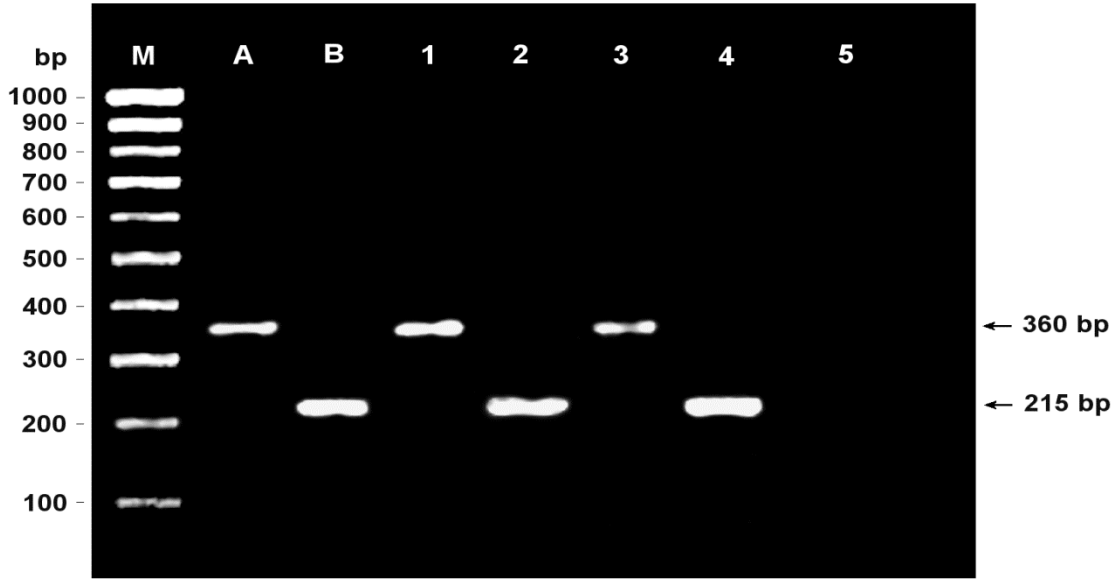
PCR tekniği ile tür spesifik primerler kullanılarak yapılan identifikasyonlarda (Şekil 2) incelenen 32 idrar örneğinden 20 (%62.5) adet, 60 gaita örneğinden de 10 (%16.6) adet olmak üzere toplam 30 adet *E. faecalis* (Tablo 4); incelenen 177 idrar örneğinden 8 (%4.5) adet ve 46 gaita örneğinden de 22 (%47.8) adet olmak üzere toplam 30 adet *E. faecium* identifiye edildi (Tablo 5).

Tablo 4. İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen *E. faecalis* kültürlerinin dağılımı

Örnekler		<i>E. faecalis</i> izolasyonu	
Türü	n	n	%
İdrar	32	20	62.5
Gaita	60	10	16.6
Toplam	92	30	32.6

Tablo 5. İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen *E. faecium* kültürlerinin dağılımı

Örnekler		<i>E. faecium</i> izolasyonu	
Türü	n	n	%
İdrar	177	8	4.5
Gaita	46	22	47.8
Toplam	162	30	18.5



Şekil 5. Enterokokların multipleks PCR yöntemi ile analizlerinin agaroz jel görüntüsü (M: PCR ranger 100 bp DNA marker; A: *E. faecalis* pozitif kontrol; B: *E. faecium* pozitif kontrol; 1: *E. faecalis* pozitif gaita örneği; 2: *E. faecium* pozitif gaita örneği; 3: *E. faecalis* pozitif idrar örneği; 4: *E. faecium* pozitif idrar örneği; 5: Negatif kontrol)

4.3. Isı Stresi Uygulamaları

Çalışmada öncelikle *E. faecalis* ve *E. faecium* referans suşları ile ön deneme amacıyla farklı sürelerde farklı ısı uygulamaları yapılarak ısı stresi oluşturuldu. Kültürlerin her biri 30 sn., 5 dk., 10 dk., 15 dk., 20 dk. ve 30 dk. süreyle 42°C, 45°C, 48°C, 50°C, 52°C, 55°C ve 60°C'lik ısılarda strese maruz bırakıldı. Yapılan çalışmalar da dikkate alınarak elektroforetik analiz sonuçlarına göre yapılan değerlendirmede, HSP sentezinin optimal olarak görülebildiği ısılar ve uygulama süreleri belirlendi. Buna göre örneklerden izole ve tanımlanmış *E. faecalis* suşlarında 42°C ve 45°C'lik ısılarda 30 dk.; *E. faecium* suşlarında ise 42°C ve 52°C'lik ısılarda 30 dk. ısı stresi uygulamasının olumlu sonuç vereceği kanısına varıldı.

4.4. Elektroforetik Protein Bant Profillerinin Analizi

Poliakrilamid jelde protein bantlarının moleküler ağırlığının tespitinde protein moleküler ağırlık standardı (Thermo, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180

kDa) kullanıldı. Elektroforez işleminden sonra her bir standart proteinin relatif hareketi 3.2.7’de belirtilen formüle göre molekül ağırlığının tespiti için öncelikle NCSS bilgisayar programı ile kalibrasyon eğrisi çıkarıldı ve ardından incelenen örneklerdeki protein bantlarının moleküler ağırlığı hesaplandı.

E. faecalis referans kültürünün 42°C ve 45°C’lerde ayrı ayrı 30’ar dk. süre ile strese maruz bırakılması sonucunda her iki ısı uygulaması ile 38, 68 ve 120 kDa moleküler ağırlıkta yeni ve farklı protein molekülleri sentezlediği belirlendi.

E. faecium referans kültürünün 42°C ve 52°C’lerde ayrı ayrı 30’ar dk. süre ile strese maruz bırakılması sonucunda her iki ısı uygulaması ile 67, 73, 80 ve 120 kDa moleküler ağırlıkta yeni ve farklı protein molekülleri sentezlediği belirlendi.

Tablo 6. *E. faecalis* suşlarında tespit edilen protein molekülleri

Uygulanan ısı	Tespit edilen protein molekülleri (%)		
	38 kDa	43 kDa	120 kDa
42°C	1 (3.3)	15 (50)	24 (80)
45°C	2 (6.6)	8 (26.6)	20 (66.6)

Tablo 7. *E. faecium* suşlarında tespit edilen protein molekülleri

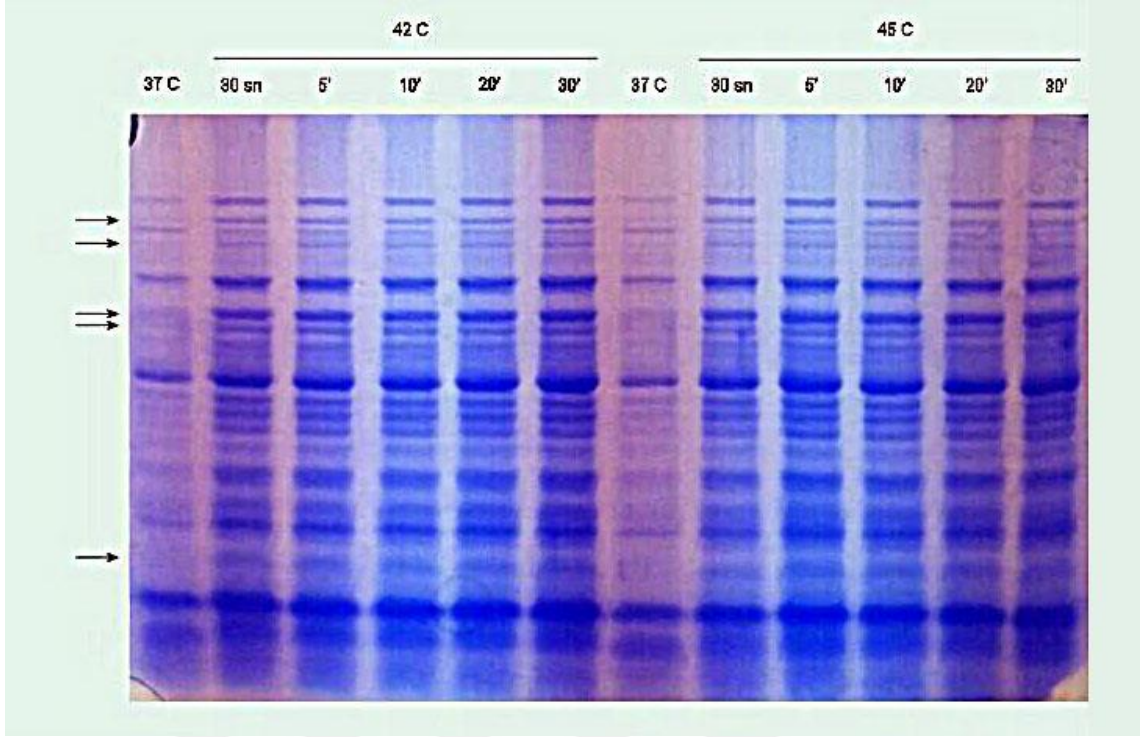
Uygulanan ısı	Tespit edilen protein molekülleri (%)			
	38 kDa	43 kDa	56 kDa	120 kDa
42°C	0	0	0	3 (10)
52°C	10 (33.3)	1 (3.3)	1 (3.3)	2 (6.6)

Örneklerden izole ve identifiye edilen 30 adet *E. faecalis* suşunda 30 dk. süre ile uygulanan 42°C’lik ısıda 38, 43 ve 120 kDa’luk protein molekülleri tespit edildi. Buna göre 1 (%3.3) izolat 38 kDa’luk protein molekülü sentezlerken; 15 izolatın (%50) 43 kDa; 24’ünün (%80) ise 120 kDa’luk protein molekülü sentezlediği tespit edildi. 45°C’lik ısıda da yine 38, 43 ve 120 kDa’luk protein molekülleri gözlemlendi. İzolatların

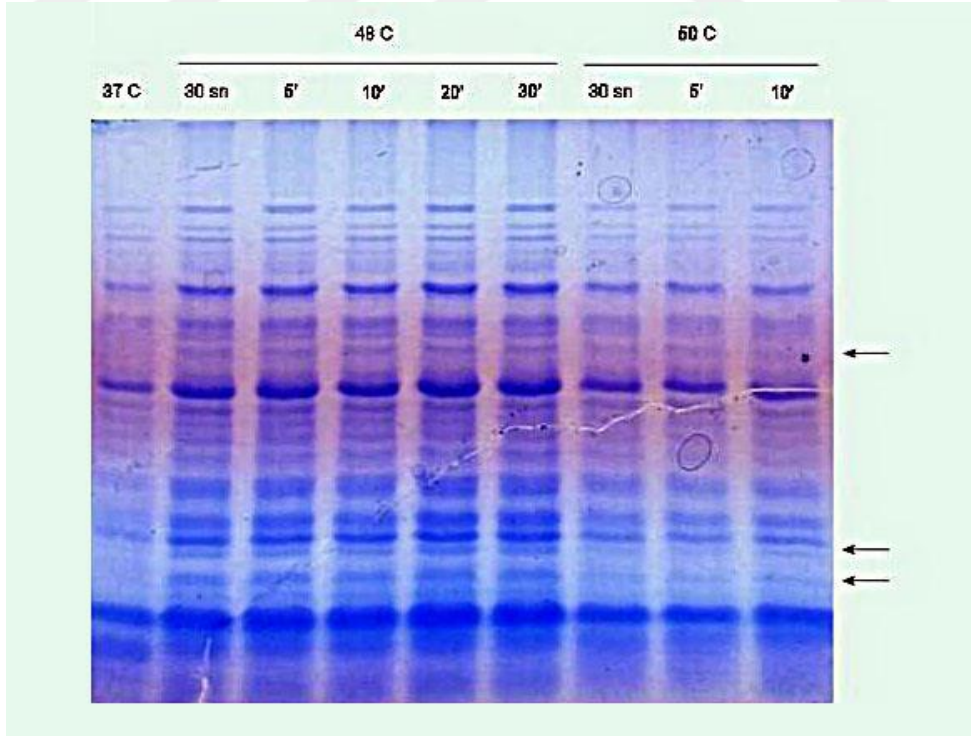
2'si (%6.6) 38 kDa'luk protein molekülü sentezlerken; 8'inin (%26.6) 43 kDa; 20'sinin (%66.6) ise 120 kDa'luk protein molekülü sentezlediği ortaya konuldu (Tablo 6).

Örneklerden izole ve identifiye edilen 30 adet *E. faecium* suşunda 30 dk süre ile uygulanan 42°C'lik ısıda sadece 3 (%10) izolatin 120 kDa'luk protein molekülü sentezlediği gözlenirken; 52°C'lik ısıda 10 (%33.3) izolat 38 kDa'luk protein molekülü sentezlerken; birer izolat (%3.3) 43 kDa ve 56 kDa; 2 izolatin (%6.6) ise 120 kDa'luk protein molekülü sentezlediği tespit edildi (Tablo 7).

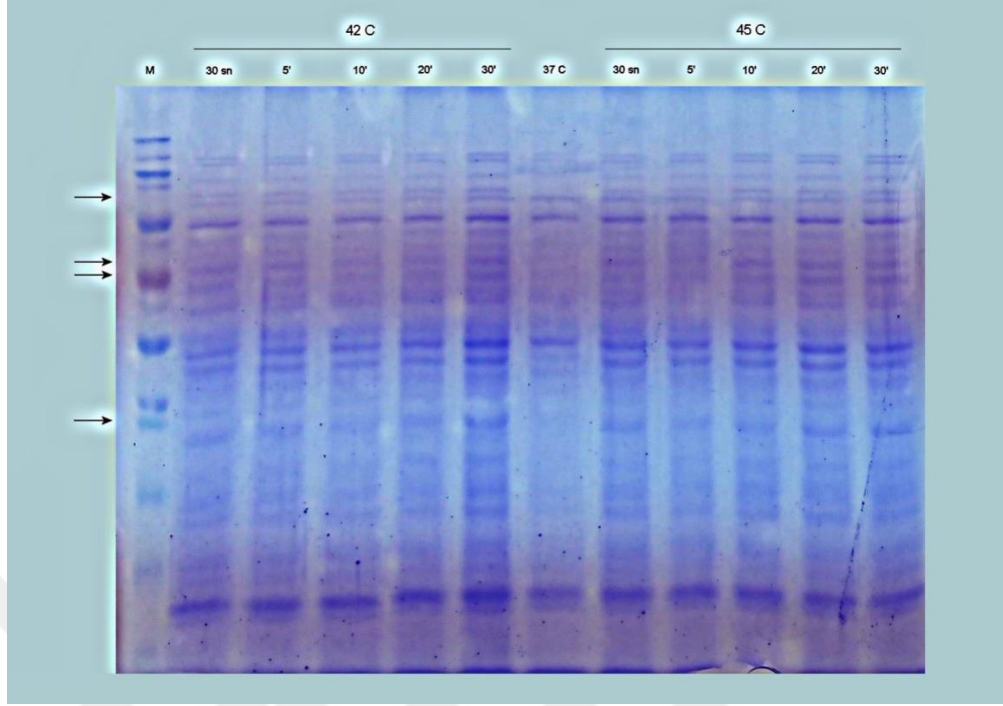




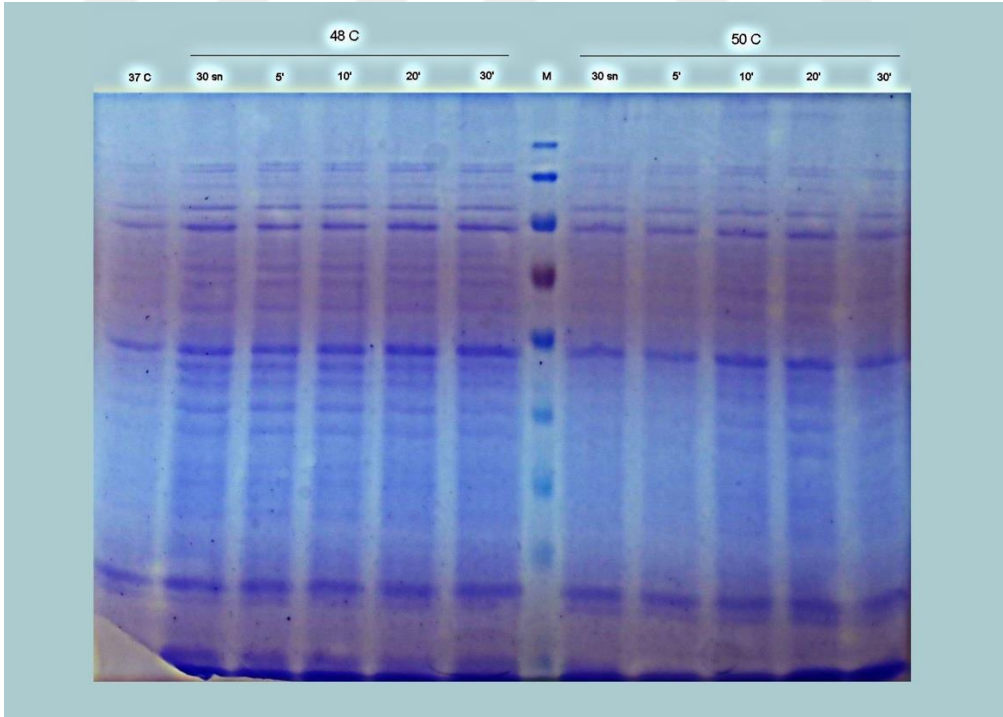
Şekil 6. *E. faecalis* referans suşunun 30 sn., 5 dk., 10 dk.,15dk., 20 dk. ve 30 dk. süreyle 42°C ve 45°C’lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları



Şekil 7. *E. faecalis* referans kültürünün 30 sn., 5 dk., 10 dk.,15dk., 20 dk. ve 30 dk. süreyle 48°C ve 50°C’lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları



Şekil 8. *E. faecium* referans suşunun 30 sn, 5 dk., 10 dk.,15dk., 20 dk. ve 30 dk. süreyle 42°C ve 45°C'lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları



Şekil 9. *E. faecium* referans kültürünün 30 sn., 5 dk., 10 dk.,15dk., 20 dk. ve 30 dk. süreyle 48°C ve 50°C'lerde ısıya maruz bırakılması ile oluşan HSP bantları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enterokoklar, insan ve hayvanlarda normal flora bakterisi olarak gastrointestinal kanalda yüksek düzeyde bulunmaları yanında deri, oral kavite, alt solunum yolu ve ürogenital sistemlerde de bulunabilmektedirler (Huycke ve ark., 1998). Virülenslerinin düşük olmasına karşın konağın vücut direncinin kırılması ile birlikte oportunistik karakterleri ön plana çıkmakta ve sıklıkla idrar yolu infeksiyonları, menenjit, endokardit, intraabdominal, deri ve yumuşak doku infeksiyonları gibi infeksiyonlarda primer veya sekonder etken olarak bulunabilmektedirler (Schouten ve ark., 1999; Ustaçelebi ve ark., 1999; Devriese ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda farklı ülkelerde enterokokların nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında ikinci sırada yer aldığı bildirilmektedir. En sık infeksiyon etkeni olan türlerden *E. faecalis* örneklerden izole edilen enterokokların %85 - 95'ini, *E. faecium* ise %5-10'unu oluşturmaktadır (Teixeria ve Facklam, 2003).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda klinik örneklerde farklı oranlarda izolasyon sonuçları görülmektedir. Özseven ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada idrar örneklerinden izole ettikleri 124 enterokok kültürünün 60'ının (%48) *E. faecalis* ve 61'inin (%49) de *E. faecium* olduğunu; Baylan ve ark. (2011) çalışmalarında aldıkları idrar örneklerinden izole ettikleri 91 adet enterokok suşunun 59'unun (%64.8) *E. faecalis*, 31'inin (%34.1) ise *E. faecium* olarak belirlendiğini; Vural ve ark. (2014)ise yine idrar örneklerinden izole ettikleri 187 enterokok suşunun 103'ünü (%55.1) *E. faecalis*, 74'ünü (%39.5) de *E. faecium* olarak belirlediklerini bildirmişlerdir.

Yazgı ve ark.(2003), çalışmalarında 163 hastanın rektal sürüntü örneğinden izole ettikleri 116 enterokok suşunun 67'sini (%57.7) *E. faecalis*, 45'ini (%38.8) de *E. faecium* olarak identifiye ettiklerini; Kaçmaz ve ark. (2003) çeşitli klinik örneklerden elde ettikleri 62 enterokok izolatının 20'sini (%74) *E. faecalis* ve 5'inide(%19) *E. faecium* olarak belirlediklerini; Ergin ve ark. (2013) ise idrar örneklerinden izole ettikleri enterokok suşundan 21 (%44.7) *E. faecalis* ve 18'inden de (%38.3) *E. faecium* olarak idedntifiye ettiklerini rapor etmişlerdir.

Bu araştırmada, multipleks PCR tekniği ile tür spesifik primerler kullanılarak yapılan identifikasyonlarda, incelenen 32 idrar örneğinden 20 (%62.5) adet, 60 gaita örneğinden de 10 (%16.6) adet olmak üzere toplam 30 adet *E. faecalis* (Tablo 4); incelenen 177 idrar örneğinden 8 (%4.5) adet ve 46 gaita örneğinden de 22 (%47.8) adet olmak üzere toplam 30 adet *E. faecium* identifiye edildi.

Bu veriler yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, bu araştırmada idrardan yapılan *E. faecalis* izolasyon oranının benzer olduğunun görüldüğü ancak *E. faecium* izolasyon oranının ise oldukça düşük olduğu gözlendi. Gaitadan yapılan *E. faecalis* izolasyon oranının bu çalışmada oldukça düşük, *E. faecium* izolasyon oranının ise benzer olduğu tespit edildi. Bu farklılıklar izolasyon teknikleri, infeksiyon durumu ve bireylerin hijyen alışkanlıkları ile ilgili olabilir.

İnsan ve birçok hayvan türünün bağırsak florasında bulunan enterokoklar aynı zamanda gıdalarda da bulunabilmektedir. Bu mikroorganizmalar hijyenik gıda ve süt kalitesinin önemli göstergelerindedir. Enterokoklar, gıdalarda, içme sularında sıcaklık başta olmak üzere çok sayıda strese maruz kalmaktadır (Boutibonnes ve ark., 1993).

Bir bakteri hücresi şayet genetik kodunda bir direnç mekanizması varsa, herhangi bir stresöre maruz kaldığında ilgili stres proteinlerini sentezleyerek korunmaya çalışır. Uygulanan stres sonucu bakteri DNA'sında transkripsiyon ile mRNA sentezlenmekte ve bu mRNA ribozomlarda transle edilerek ilgili stresten korunmada etkili şok proteinin sentezlenmesinde temel teşkil etmektedir. Bu proteinler bakterinin fizyolojisini etkileyerek, maruz kaldığı stres ile mücadele etmesine katkı sağlamaktadır. Sentezlenen stres proteini tek bir tür stres faktörüne karşı etkili olabildiği gibi birden fazla türde stres faktörüne karşı da etkili olabilir. Öte yandan her bakterinin bir strese karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları bazen aynı bazen de farklı olabilmektedir. Aynı bakterinin farklı gelişim evrelerinde (log faz, lag faz, stationer faz gibi) aynı stresöre karşı geliştirdiği direnç mekanizması da farklı olabilmektedir (Arsene ve ark., 2000; Neidhardt ve VanBogelen, 2000; Cronan, 2002; Yousef ve Courtney, 2003).

Bakterilerin üremesi üzerine olumsuz etkileri olan en önemli stres faktörlerinden biri ısı stresidir. Strese giren bakteri tarafından çeşitli şok proteinlerinin sentezi, sıcaklığın yanında diğer çevresel koşulların değişmesiyle de indüklenebilmektedir. Bu

proteinlerden bazılarının sentezi sadece ısı ile indüklendiği için, bu tip proteinlere doğrudan HSP adı verilmektedir (Segal ve Ron, 1998).

Yenidünya (2005) bazı *bacillus* türlerinin ısı şok proteinlerinin belirlenmesi konulu tez çalışmasında 48 ve 52°C'lik sıcaklık uygulamalarının spor canlılığını önemli derecede düşürdüğünü ve SDS-PAGE analiz sonuçları farklı bakteri klonlarının ürediğini 39, 40 ve 42 kDa'luk proteinlerin yüksek sıcaklığa dayanıklılığı sağlayan farklı ısı şok proteinleri olduğunu ortaya koymuştur.

S. aureus ile yapılan bir çalışmada, ısıya dayanıklılıkta indüklenen σ^B 'nin rolü araştırılmıştır. 45°C'de 5, 30 ve 120 dk. süreyle uygulama yapılmış ve 58°C ısıya termotolerans geliştiğini saptamışlardır (Cebrian ve ark., 2009).

Chiang ve ark. (2008) yaptıkları çalışmalarında *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis* ve *S. bovis* suşlarında hsp70, hsp40 ve hsp10'a ait ısı şok protein genlerini tespit ettiklerini ve bunlardan PCR primerleri dizayn ettiklerini bildirmişlerdir.

Lactobacillus plantarum suşuna ısı, soğuk ve ethanol stresi uygulanarak yapılan bir çalışmada stres sonrası sentezlenen ve 18.54 kDa olarak hesaplanan protein sekansını, HSP 18.55 olarak adlandırmışlardır (Spano ve ark., 2004).

Enterokoklar ile ilgili olarak Laport ve ark. (2003)'ün yaptıkları çalışmada *E. faecium* suşunun 42°C, 45°C, 48°C, 50°C, 52°C ve 55°C gibi farklı sıcaklıklarda 60 dk. süreyle ısı şok proteinlerini ve ısı direncine bağlı üreme durumlarını araştırmışlardır. Bunu takiben arttırılarak 70°C'ye getirilen ısıda 2 saat süreyle muamele sonrasında canlı kalabilen hücrelerin var olduğunu belirlemişlerdir. Western blotanalizi ile ısı kaynaklı proteinleri, GroEL (65kDa) ve DnaK (75kDa) olarak tespit etmişlerdir.

E. faecalis ile yapılan benzer bir çalışmada da 48 ile 94 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip ısı şok proteinlerinin varlığı ortaya konulmuştur (Boutibonnes ve ark., 1993).

Laport ve ark. (2005) başka bir çalışmalarında *E. faecium* suşuna 42°C ve 50°C de 10 dk. ısı muamelesi ve 37°C ısıda %6.5 NaCl veya %0.01 SDS veya 2.5 mM H₂O₂ ile 10 dk'lık muamelelerden sonra yanıt olarak DnaK ve GroEL genlerinin indüklendiğini bildirmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada *E. faecium* BAR1 ve *E. faecalis* MI2 suşlarına farklı ısı derecelerinde ve farklı sürelerde ısı işlemi uygulamışlardır. 37°C de inkübe edilen bakteri suşlarının log faz hücre toleransını 55°C, 60°C, 62.5°C'lerde 3 dk. ısı işlemi uygulayarak oluşturmuşlardır. 50°C de 15 dk. ısı işlemi uygulayarak ısı şok proteinlerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, *E. faecium* BAR1 hücrelerinin 62.5°C'de 30 dk., *E. faecalis* MI2 hücrelerinin ise 62.5°C'de 20 dk. canlı kalabildiğini bildirmişlerdir.

E. faecalis ATCC 19433 suşuna sıcaklık ve çeşitli stres uygulamaları (etanol, safra tuzları, NaCl, H₂ O₂ ve pH değişimi) ile bakteri duyarlılığı ve kazanılan toleransı araştırılmıştır. 2-D elektroforezi yöntemi ile analiz neticesinde, bu çevresel streslere maruz kalma esnasında 167 stres proteini sentezlediğini saptamışlardır. Western blot analizi ile ikisi DnaK ve GroEL olmak üzere altı tane genel stres proteini tespit etmişlerdir (Rince ve ark.,2000).

Flahaut ve ark. (1997) *E. faecalis* suşu ile yaptıkları çalışmada sıcaklık stresi DnaK ve GroEL protein sentezinin artması arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sıcaklık dışında NaCl, etanol, SDS ve safra tuzları ile muamele etmişlerdir. 2-D jel western blot analizi ile 50°C de 30 dk. ısı uygulanan bakterinin DnaK ve GroEL sentezlediğini tespit etmişler, aynı zamanda sıcaklığın DnaK ve GroEL sentezinin en verimli indüktörü olduğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırmada *E. faecalis* referans kültürünün 42°C ve 45°C'lerde ayrı ayrı 30'ar dk. süre ile strese maruz bırakılması sonucunda her iki ısı uygulaması ile 38, 68 ve 120 kDa moleküler ağırlıkta yeni ve farklı protein molekülleri sentezlediği; *E. faecium* referans kültürünün ise 42°C ve 52°C'lerde ayrı ayrı 30'ar dk. süre ile strese maruz bırakılması sonucunda her iki ısı uygulaması ile 67, 73, 80 ve 120 kDa moleküler ağırlıkta yeni ve farklı protein molekülleri sentezlediği belirlendi.

Çalışmada izole edilen 30 adet *E. faecalis* suşunda 30 dk. süre ile 42°C ve 45°C'lik ısı uygulaması sonucunda 38, 43 ve 120 kDa'luk protein molekülleri tespit edildi. Aynı sayıdaki *E. faecium* izolatlarında ise 30 dk. süre ile uygulanan 42°C'lik ısıda sadece birkaç izolatın 120 kDa'luk protein molekülü sentezlediği gözlenirken; 52°C'lik ısıda 38, 43, 56 ve 120 kDa'luk protein moleküllerinin sentezlendiği ortaya konuldu.

Yapılan literatür taramalarında *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının ısı stresine yanıtlarına yönelik ayrıntılı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle stres proteini ile ilgili yapılan çalışmaların bu çalışma ile ilişkilerinin çok az olmasından dolayı tartışılacak ve karşılaştırılacak bir veri bulunamamıştır. Bu durum çalışmayı daha özgün kıldığı düşünülebilir.

Bu çalışmada sonuç olarak;

- Van ve yöresinde *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının izolasyon oranının diğer yörelere göre daha düşük olduğu tespit edildi.
- Enterokok türlerindeki fenotipik değişikliklerden dolayı PCR bazlı tekniklerle yapılacak epidemiyolojik çalışmaların identifikasyon güvenilirliklerinin oldukça yüksek olduğu görüldü.
- İnsan orijinli enterokok suşlarında ısı şok proteinlerinin sentezlenmesi, bakterinin çeşitli olumsuz koşullara dayanıklılığının da bir göstergesi olduğundan potansiyel riskin önemi bir kez de bu çalışmayla vurgulandı.
- Yapılacak diğer çalışmalarda *E. faecalis* ve *E. faecium* bakteri türündeki HSP molekülerinin moleküler biyolojik analizlerle karakterizasyonlarının yapılmasının önemli olacağı kanısına varılmıştır.

ÖZET

Ateş S., İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole Edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* Suşlarının Isı Şok Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Analizi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Veteriner Program), Yüksek Lisans Tezi, Van, Türkiye, 2017.Bu çalışmada, insanlarda idrar ve gaita örneklerinden izole edilen enterokokların ısı şok proteinlerinin sentezi araştırıldı. Bu amaçla multipleks PCR tekniği ile incelenen 32 idrar örneğinden 20 (%62.5) adet, 60 gaita örneğinden de 10 (%16.6) adet olmak üzere toplam 30 adet *E. faecalis* identifiye edildi. İncelenen 177 idrar örneğinden 8 (%4.5) adet ve 46 gaita örneğinden de 22 (%47.8) adet olmak üzere toplam 30 adet *E. faecium* identifiye edildi. SDS-PAGE yöntemi ile yapılan protein bant analizlerinde; *E. faecalis* ve *E. faecium* referans suşları ile ön deneme amacıyla farklı sürelerde farklı ısı uygulamaları yapılarak ısı şok proteini (HSP) sentezinin optimal olarak görülebildiği ısılar ve uygulama süreleri belirlendi. *E. faecalis* referans suşunun 42°C ve 45°C'lerde ayrı ayrı 30'ar dk. süre ile strese maruz bırakılması sonucunda, her iki ısı uygulaması ile 38, 68 ve 120 kDa moleküler ağırlıkta yeni ve farklı protein molekülleri sentezlediği belirlendi. *E. faecium* referans kültürünün ise 42°C ve 52°C'lerde ayrı ayrı 30'ar dk. süre ile strese maruz bırakılması sonucunda her iki ısı uygulaması ile 67, 73, 80 ve 120 kDa moleküler ağırlıkta yeni ve farklı protein molekülleri sentezlediği belirlendi. İncelenen 30 adet *E. faecalis* izolatında 30 dk süre ile uygulanan 42°C'lik ısıda 38 (%3.3), 43 (%50) ve 120 (%80) kDa'luk protein molekülleri tespit edildi. 45 °C'lik ısıda da yine 38 (%6.6), 43 (%26.6) ve 120 (%66.6) kDa'luk protein molekülleri gözlemlendi. Aynı sayıdaki *E. faecium* izolatlarında ise 30 dk. süre ile uygulanan 42°C'lik ısıda sadece 3 (%10) izolatın 120 kDa'luk protein molekülü sentezlediği gözlenirken; 52°C'lik ısıda 38 (%33.3), 43 (%3.3), 56 (%3.3) ve 120 (%6.6) kDa'luk protein molekülü sentezlediği tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: *E. faecalis*, *E. faecium*, SDS-PAGE, Isı Şok Proteini, HSP

SUMMARY

Ates S., SDS-PAGE Analysis of Heat Shock Proteins of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Urine and Feces Samples, Yüzüncü Yıl University, Health Sciences Institute, Department of Microbiology (Veterinary Programme), Master Thesis, Van, Turkey, 2017. In this study, the synthesis of heat shock proteins (HSP) was investigated in enterococci isolated from urine and stool samples of humans. For this purpose, a total of 30 *E. faecalis* isolates, 20 (62.5%) from 32 urine and 10 (16.6%) from 60 stool samples were identified by multiplex PCR technique. A total of 30 *E. faecium* isolates were identified as 8 (4.5%) from 177 urine and 22 (47.8%) from 46 stool samples. In protein band analysis performed on SDS-PAGE; *E. faecalis* and *E. faecium* reference strains were subjected to different heat treatments at various application times for preliminary testing to determine optimal temperatures and application times for HSP synthesis. According to the treatment of *E. faecalis* reference strain with 42°C and 45°C temperatures for 30 min. separately, new and different protein molecules as 38, 68 and 120 kDa molecular weight, were determined respectively. After treatment of *E. faecium* reference strain at 42°C and 52°C temperatures for 30 min. respectively, it synthesized new and different protein molecules at 67, 73, 80 and 120 kDa molecular weight at both heat treatments. Protein molecules of 38 (3.3%), 43 (50%) and 120 (80%) kDa were detected at 42°C in 30 *E. faecalis* isolates. Same protein molecules were also observed at 45°C. While only 3 *E. faecium* isolates synthesized 120 kDa protein at 30 min with 42°C treatment, 38, 43, 56 and 120 kDa protein molecules were observed at 52°C.

Keywords: *E. faecalis*, *E. faecium*, SDS PAGE, Heat Shock Protein, HSP

KAYNAKLAR

- Ahmad M, Smith DG, Mahboob S (2002). Determination of the heat shock response in *Enterococcus faecium* and *E. faecalis*. *Int J Agric & Biol*, 4, 2, 231-233.
- Akan ÖA (2004). Enterokok türlerinin mikrobiyolojisi. Ed: Ünal S, Vahapoğlu H. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara, 5-9.
- Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS (1997). Özel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınevi, 4.Baskı, Seri No:26, Ankara. 125-137.
- Arias CA, Contreras GA, Murray BE (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*, 16, 6, 555-562.
- Arsene F, Tomoyasu T, Bukau B (2000). The heat shock response of *E. coli*. *Int Food Microbiol*, 55, 3-9.
- Aşkar T, Ergün N, Turunç V (2007). Isı şok proteinler ve fizyolojik rolleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 13, 1, 109-114.
- Aydın M (2004). Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Standart Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler, "Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji". Güneş Yayınevi, Ankara. Konu:11, 91-110.
- Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, et al. (2005). Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation* 111, 394-434.
- Başustaoğlu A, Aydoğan H (2002). Enterokoklar. *Inf Hast Serisi*, 5, 2, 45-60.
- Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Çitil BE, Turan D, Öngen B, Özyurt M, Açıkel CH, Haznedaroğlu T (2011). Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virulens faktörleri arasındaki ilişki. *Mikrobiyol Bul*, 45, 3, 430-445.
- Bilström H (2008). Molecular epidemiology of clinical *E. faecium*. Carolinska Institutet. Thesis.
- Bitsori M, Maraki S, Raissaki M, et al. (2005). Community-acquired enterococcal urinary tract infections. *Pediatr Nephrol*, 20, 11, 1583-1586.
- Boulanger JM, Ford-Jones EL, Matlow AG (1991). Enterococcal bacteremia in a pediatric institution: a four-year review. *Rev Infect Dis*, 13, 847-56.
- Boutibonnes P, Giard JC, Hartke A, Thammavongs B, Auffray Y (1993). Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis*. *A Van Leeuw*, 64, 47-55.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to Abiotic Stresses. In W Gruissem, B Buchannan, R Jones, Eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 1158–1249.

- Buchner JJ, Grallet H, Jacob U (1998). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonative substrate protein, *Method Enzymol*, 290, 323-338.
- Burke JJ (2001). Identification of genetic diversity and mutations in higher plant acquired thermotolerance. *Physiol Plantarum*, 112, 2, 167-170.
- Butler KM (2006). Enterococcal Infection in Children. *Sem Ped Inf Dis*, 128-139.
- Cebrián G, Condón S, Mañas P (2009). Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Universidad de Zaragoza, C/Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain
- Chiang YC, Pai WY, Chen CY, Tsen HY (2008). Institute of Industrial Biotechnology, Hung Kuang University, 34 Chung-Chi Road, Shalu, Taichung County 433, Taiwan, ROC bDepartment of Food Science and Nutrition, Hung Kuang University, 34 Chung-Chi Rd, Shalu, Taichung County 433, Taiwan, ROC
- Christie C, Hammond J, Reising S, et al. (1994). Clinical and molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in a pediatric teaching hospital. *J Pediatr* 125, 392-399.
- Cox LA, Popken DA, Mathers JJ (2009) Human health risk assessment of penicillin/aminopenicillin resistance in enterococci due to penicillin use in food animals. *Risk Analysis* 29, 796-805.
- Cronan JE (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 5, 202-205.
- Devriese L, Baele M, Butaye P (2006). The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes*.4, 163-174.
- Diker KS, Esendal OM, Akan M (2000). Epidemiology of ovine *Campylobacter* infection determined by numerical analysis of electroforetic protein profiles. *J Vet Med B*, 47, 739-743.
- Dikici A (2009). Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriyel Adaptasyonlar ve Mekanizmaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Derg*, 4, 3, 59-68.
- Doubuzet J, Sakuma Y, Kasuga M et al., (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription factors that function in drought-, high salt-and cold responsive gene expression. *Plant J*, 33, 751-763.
- Draper NR, Smith H (1998). Applied Regression Analysis, Third edition, John Wiley, New York.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal o Clin Microbiol*, 33, 1, 24-27.
- Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, et al. (1995). Vancomycin-resistant *E. faecium* bacteriemia: Risk factors for infection. *Clin Infect Dis*, 20, 1120 - 1126.
- Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, et al. (1996). Vancomycin-resistant enterococcal bacteriemia: Natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis*, 23, 6, 1234-1239.

- Ergin ÖY, Bayram ED, Uzun B, Güngör S, Demirdal T (2013). İdrar kültürlerinden izole edilen *Enterococcus* türleri ve antibiyotik dirençleri. *ANKEM Derg*, 27, 4, 173-178.
- Eroğlu C, Aydoğan S, Pekbay A (2003). Nozokomiyal *Enterococcus faecium* menenjitisi: Olgu sunumu. *Inf Derg (Tr J Infect)*. 17, 205-207.
- Esen Ş (2004). Enterokokların neden olduğu infeksiyonlar ve tedavi seçenekleri. Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara, 159-170.
- Facklam RR, Sahm FD (1995). Enterococcus. in: Manual of Clinical Microbiology 6th edition. Washington D.C. American Society for Microbiology; 308 –314.
- Facklam RR, Tenover FC (1998). Enterococcus. In: Collier L, Tenover FC, Murray PR (eds). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial infections*. Vol 2 (Systematic Bacteriology). Ed: Edward Arnold, 9th edition. London, 669-682.
- Fenton WA, Horwich AL (1997). GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci*, 6, 4, 743–760.
- Ferrieri P, Gewitz MH, Gerber MA et al. (2002). Unique features of infective endocarditis in childhood. *Pediatrics* 109, 931-943.
- Fisher K, Phillips C (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol*, 155, 1749-1757.
- Flahaut S, Frere J, Boutibonnes P, & Auffray Y (1997). Relationship between the thermotolerance and the increase of DnaK and GroEL synthesis in *Enterococcus faecalis* ATCC19433. *J Basic Microb*, 37, 4, 251-258.
- French GL (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Ag*, 36, 3-7.
- Gültekin M (2004). Enterokoklar: in: Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi; 121 – 140.
- Hecker M, Schumann W, Volker U (1996). Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 199, 417-428.
- Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A (2009). Vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. *J Public Health*, 17, 243-249.
- Honkinen O, Lehtonen OP, Ruuskanen O, et al. (1999). Cohort study of bacterial species causing urinary tract infection and urinary tract abnormalities in children. *BMJ* 319, 770-771.
- Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS (1998). Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*, 4, 2, 239-249.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB (2004). Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *J Clin Microbiol*, 42, 8, 3558-3565.
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268, 3, 1517-1520.

- Kaçmaz B, Akça G, Çağlar K, Sultan N (2003). Enterokoklarda antimikrobiyel duyarlılık. *ANKEM Derg*, 17, 28-32.
- Kalina AP (1970). The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int J Sys Evolution Microbiol*, 20, 2, 185-189.
- Kariyama R, Mitsuhashi R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H (2000). Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol*, 38, 3092-3095.
- Kaye D (1982). Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch Intern Med*, 142, 2006 – 2009.
- Klein G (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol*, 88, 2, 123-131.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop G, Woods G (2005). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co 700-711.
- Konkel MF, Bong JK, Klena JD, Young CR, Zuprin R (1998). Characterization of the Thermal stress Response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*, 66, 3666-3672.
- Korten V (2002). Enterokoklar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2.baskı. İstanbul 1497-1506.
- Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R (1992). Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*, 60, 1, 25 – 30.
- Laemmli NK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laport MS, da Silva MR, Silva CC, do Carmo de Freire Bastos M, Giambiagi-deMarval M (2003). Heat-resistance and heat-shock response in the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*, 46, 313–317.
- Laport MS, dos Santos LL, Lemos JAC, do Carmo F. Bastos M, Burne RA, Giambiagi-de Marval Ma (2005) Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21491-590, Brazil b Department of Oral Biology, College of Dentistry, University of Florida, Gainesville, FL 32610, USA
- Lautenbach E, Bilker W, Brennan P (1999). Enterococcal bacteremia: Risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20, 318-323.
- LeClerq R, Derlot I, Duval J, et al. (1998). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*, 319, 157-161.
- Lindquist S, Craig EA (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22, 1, 631-677.
- Maestri E, Klueva N, Perrotta C, Gulli M, Nguyen HT, Marmiroli N (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol Biol*, 48, 5-6, 667-681.

- McNeeley DF, Saint-Louis F, Noel GJ (1996). Neonatal enterococcal bacteremia: an increasingly frequent event with potentially untreatable pathogens. *Pediatr Infect Dis J*, 15, 800-805.
- Moat AG, Foster JW, Spector MP (2002). Microbial Physiology, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Fourth edition, New York, 582-601.
- Moellering RC (2005) *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Ed. Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. New York. Churchill Livingstone, pp: 2411-2421.
- Moellering RC Jr (1981). Infections due to group D streptococci. *Infect Dis Rev*, 6, 1-7.
- Moellering RC Jr (1992). Emergence of enterococcus as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 14, 1173-1178.
- Msadek T (1999). When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiol*, 7, 5, 201–207.
- Murray BE (1990). The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev*, 3, 1, 46-65.
- Neidhardt FC, VanBogelen RA (2000). Proteomic analysis of bacterial stress response, in Bacterial Stress Responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis, Eds. Washington, DC.: American Society for Microbiology Press, pp: 445-452.
- Nollen EA, Brunsting JF, Roelofs H, Weber LA, Kampinga HH (1999). In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol*, 19, 3, 2069-2079.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol*, 9, 3, 1298-1308.
- Özseven AG, Sesli Çetin E, Cicioğlu Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 25 (4), 256-262.
- Patterson JE (2000). New Gram-positive agents in nosocomial infection. *Curr Opin Infect Dis*, 13, 593-598.
- Pockley AG (2001). Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev Mol Med*, 3, 23, 1-21.
- Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C (2005). Study of faecal colonization by vanA-containing Enterococcus strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal. *J Antimicrob Chemother*, 55, 2, 278-280.
- Rince A, Flahaut S, Auffray Y (2000). Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol*, 55, 1, 87-91
- Robert C, Moellering JR (2000). Enterococcus species bovis and Leuconostoc species. Principles and Practise of Infectious Disease 5th edition. Churchill – Livingstone; 2147 – 2153.

- Rosen R, Ron EZ (2002). Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. *Mass Spectrometry Rev*, 21, 244–265.
- Rudy M, Zientara M, Bek T, et al. (2005). Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. *Pol J Microbiol*, 54, 77-80.
- Ruoff KL, Maza L, Murtagh MS (1990). Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 28, 435-437.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression, *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 3, 998-1009.
- Schleifer KH, Klipper BR (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol*, 10, 1 – 19.
- Schlesinger MJ (1990). Heat shock proteins. Minireview. *J Biol Chem*, 265, 21, 12111-12114.
- Schouten MA, Vose A, Hoogkamp-Karstanje JAA (1999). Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Ch*, 43, 10, 2542-2546.
- Segal G, Ron EZ (1998). Regulation of heat shock response in bacteria. *Ann. NY Acad Sci*, 851, 147–151.
- Shepard BD, Gilmore MS (2002). Antibiotic resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microb Infect* 4, 215-224.
- Simões-Araújo JL, Rumjanek NG, Margis-Pinheiro M (2003). Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. *Braz J Plant Physiol*, 15, 1, 33-41.
- Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A (2008). Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 128, 2, 111-121.
- Spano G, Beneduce L, Perrotta C, Massa S, (2004). Cloning and characterization of the hsp 18.55 gene, a new member of the small heat shock gene family isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *Res Microbiol*, 156, 2, 219-224.
- Stoll BJ, Hansen NI, Higgins RD, et al. (2005). Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr Infect Dis J*, 24, 7, 635-639.
- Teixeira LA, Facklam RR (2003). Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition, Washington. ASM Pres. pp: 422-433.
- Uno Y, Furuhashi T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Arabidopsis basic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 21, 11632-11637.
- Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara.s: 81-108,

- Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, et al. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1, 57-58.
- Üzümçü Z (2009). *Pseudomonas* spp. Suşlarında Cold Shock Protein İzolasyonu ve SDS-PAGE Analizi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana
- Vierling E (1997). The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol Plant*, 19, 4, 539-547.
- Vinocur B, Altman A (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 2, 123-132
- Vural DG, Temiz H, Aktar GS, Onur A, Ayaydın Z, Turhanoglu M, Vural H (2014). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik direnç oranları, 29. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Bodrum, 28-31 Mayıs 2014, *ANKEM Derg*, 28, Ek 1, 26.
- Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D ve ark. (1999). Vankomisine dirençli *E. faecium* suşu. *Ankem Derg*, 13, 1-5.
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov B, Altman A (2004). Molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends Plant Sci*, 9, 244-252.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot*, 47, 3, 325-338.
- Winn WC (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. E. W. Koneman (Ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Yazgı H, Ertek M, Uslu H, Kadanalı A, (2003). Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci ile beta laktamaz üretimi ilişkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 33, 4, 333-336.
- Yenidünya E (2005). Bazı *Bacillus* Türlerinin Isı Şok Proteinlerinin Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Yıldırım M (2007). Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen Enfeksiyonlar. *Düzce Üniv Tıp Fak Derg*, 2, 46-52.
- Yousef AE, Courtney PD (2003). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. In: "Microbial Stress Adaptation and Food Safety" AE Yousef and VK Juneja (Eds). CRC Press, New York. pp:1-25.
- Zügel U, Kaufmann SH (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 12, 1, 19-39.

ÖZGEÇMİŞ

Sevil ATEŞ, 1989 yılında Tunceli’de doğdu. İlköğrenimini burada, orta öğrenimini İzmir’de tamamladı. 2007 yılında Marmara Üniversitesi, İstanbul Zeynep Kamil Sağlık Yüksekokulu Ebelik bölümüne başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2012 Yılında Sağlık Bakanlığı’na bağlı Erciş Devlet Hastanesi’ne atandı. 2012 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı. 2014 yılında Beykoz Devlet Hastanesi’nde çalışmaya başladı. Halen aynı hastanede görev yapmaktadır.



EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURUL KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:06	Tarih: 05.09.2013
	Yrd.Doç.Dr. İsmail Hakkı EKİN sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda bilgileri verilen "İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole Edilen Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium Isı Şok Proteinlerinin Araştırılması" isimli klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI:	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç.Dr. Oğuz TUNCER

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Doç.Dr. Oğuz TUNCER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Şükran SEVİMLİ	Tıp Tarihi ve Etik	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Sıddık KESKİN	İstatistik Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Meriham KURDOĞLU	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr. HALİ GÜMRÜKÇÜOĞLU	Kardiyoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Ufuk ÇOBANOĞLU	Göğüs Cerrahi	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr. İlhan GEÇİT	Üroloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Servet KAVAK	Biyofizik Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Bilal ÇEĞİN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç.Dr. Hüseyin BEĞENİK	Dahiliye	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Fatih GARÇA	KBB	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Ersoy ÖKSÜZ	Farmakoloji Uzmanı	Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Fatma PEKER	Hukuk	Van II özel İdaresi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Çiğdem ÖNER	Üniversite Mezunlu	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Ek 2. Hastane İzin Belgesi



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Van İli Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Erciş İlçe Devlet Hastanesi

İLGİLİ MAKAMA

Hastanemiz personeli Sevil ATEŞ'in tez çalışması "İdrar ve gaita örneklerinden izole edilen Enterococcus faecalis ve Enterococcus faecium suşlarının ısı şok proteinlerinin SDS PAGE yöntemiyle belirlenmesi" için hastanemiz Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen idrar ve gaita örneklerinden izolasyon yapmasında Kamu hastaneler birliği sekreterliğinden alınan olur yazısına istinaden sakınca yoktur.

Uz.Dr.İrfan BİNİCİ
Baştabip/Hastane Yöneticisi

Ek 3. Hasta Onam Formu

ERCİŞ DEVLET HASTANESİ ARAŞTIRMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Sayın hasta veya

Lütfen, elinize verilen bu belgeyi dikkatlice okuyunuz. Araştırma ile ilgili detaylı bilgi belgede var olmakla birlikte sözlü olarak da verilecektir. Bu belgede haklarınız, araştırmanın yararları ve riskleri konusunda detaylı bilgi yer almaktadır. Bu açıklamaların amacı sağlığınız ile ilgili konularda sizi bilgilendirmek ve bu sürece sizi daha bilinçli bir biçimde ortak etmektir. Lütfen, anlamadığınız hususları belirtin. **Araştırmamıza katıldığınız için teşekkür ederiz.**

Araştırmanın adı: İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının Isı Şok Proteinlerinin Araştırılması.

Araştırmanın konusu, amacı, kullanılacak yöntem, süre ve süreci:

Araştırmamız **MİKROBİYOLOJİ** konusu hakkındadır. Araştırmada İdrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan bazı bakterilerden olan Enterokokların bazı özellikleri hakkında daha detaylı bilgi sahibi olunması amaçlanmaktadır.

Araştırmayla ilgili önerilen işlem /süreç:

- Araştırmamız için önerdiğimiz işlem/süreç: Kişilere verilen kaba idrar örneğini vermesi
.....
.....

Araştırma sırasında oluşabilecek zararlar veya olası riskler:

- Araştırmamızın riski yoktur
.....
.....

Araştırma sırasında oluşabilecek araştırmaya özel riskler:

- Araştırmamızın riski yoktur
.....
.....

Araştırmanın sağlayacağı olası yararlar:

Araştırmamız size/ topluma şu yararları sunacaktır.

- Sindirim sistemi ve idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan bakterilerin (Enterokokların) bazı özellikleri hakkında daha detaylı bilgi sahibi olmak
.....
.....

Anestezi:

Araştırmada herhangi bir tıbbi girişimde bulunulmayacaktır.

Araştırmanın finansı:

BU ARAŞTIRMAYA KATILDIĞINIZ İÇİN SİZDEN EK BİR ÜCRET TALEP EDİLMEYECEK VE SİZE HERHANGİ BİR ÖDEME DE YAPILMAYACAKTIR.

Sayın hasta/ katılımcı/.....lütfen, aşağıda yer alan yazıları dikkatle okuyunuz ve **ilgili boşluğu doldurunya dailgili kutucuğu işaretlevin.**

1. Araştırma ile ilgili açık ve sade bir ifade ile anlatılan ön bilgileri aldıktan ve elimdeki olur formunu okuduktan sonra araştırmaya davet edildim. Söz konusu daveti;
 Kabul ettim. **Kabul etmedim.**
2. Araştırmada dikkat edilecek hususları okudum ve dinledim. Araştırma ile ilgili aklıma takılan sorularımı sordum. Gereken aydınlatıcı cevapları
 Aldım, anladım. **Almadım, anlamadım.**
3. Kimliğimin gizli tutulması ve yalnızca eğitim ve araştırma amaçlı kullanılması koşulu ile bana uygulanacak girişim/televi sırasında fotoğraf çekilmesine ya da kayıt yapılmasına;
 Onay veriyorum **Onay vermiyorum.**
4. Tanısal girişimlerin, tıbbi ve cerrahi tedavilerin yararlarını ve olası risklerini öğrendim, yapılacak işlemleri
 Kabul ediyorum **Kabul etmiyorum**
5. Araştırma bilgilendirme sürecine okuma/yazmam olmadığı veya tek başıma karar vermek istemediğim içinkatıldı.
6. Araştırma ile ilgili tarafımdan alınan verilerin gizli tutulacağını,
 Biliyorum **Bilmiyorum**
7. Araştırmadan istediğim zaman çekilme hakkımın olduğunu,
 Biliyorum **Bilmiyorum**
8. Araştırma sonucunda herhangi ücret almayacağımı/vermeyeceğimi;
 Biliyorum **Bilmiyorum**
9. Tıbbi bir risk ortaya çıkarsa ücretsiz tıbbi tedavi yapılacağını
 Biliyorum **Bilmiyorum**
10. Araştırma sonucunun olası faydaları konusunu detaylı
 Biliyorum **Bilmiyorum**

Tarih: / /

Katılımcının

Adı-Soyadı :
Doğum Tarihi :
Adresi :
.....
Tel. No :

Sorumlu Araştırmacının

Adı-Soyadı :
Kurum Sicil No :
İmza :

Acil Durumlarda Olur Alınacak Yasal



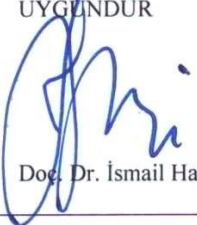
Temsilcisinin

Adı-Soyadı :
Adresi :
.....
Tel. No :

**Kanuni yeterliliği olmayan hastalar için veli /
vasinin**

Adı-Soyadı :
Adresi :
.....
Tel. No :

Ek 4. Tez Orijinallik Raporu

	YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU
Tarih: 27 / 01 / 2017	
Tez Başlığı / Konusu: İdrar ve Gaita Örneklerinden İzole Edilen <i>Enterococcus faecalis</i> ve <i>Enterococcus faecium</i> suşlarının İsi Şok Proteinlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Analizi	
<p>Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 31 sayfalık kısmına ilişkin, 27 / 01 / 2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından "Turnitin" intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 (Dört)'tür.</p> <p>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</p> <ul style="list-style-type: none">- Kabul ve onay sayfası hariç,- Teşekkür hariç,- İçindekiler hariç,- Simge ve kısaltmalar hariç,- Gereç ve yöntemler hariç,- Kaynakça hariç,- Alıntılar hariç,- Tezden çıkan yayınlar hariç,- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) <p>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p> <p style="text-align: right;"></p>	
Adı Soyadı : Sevil ATEŞ Öğrenci No : 11931210002 Anabilim Dalı : Veteriner Mikrobiyoloji Programı : Yüksek Lisans Statüsü: Y.Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/>	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  Doç. Dr. İsmail Hakkı EKİN	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Prof.Dr.Hasan YILMAZ YYÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü (Unvan, Ad Soyad, İmza) 