**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# DİŞ ÇÜRÜKLÜĞÜ OLAN ÇOCUKLARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS SPP*'NİN ADEZYON VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

**Mustafa Ayad Jasim JASIM**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI**
**2023**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Mustafa Ayad Jasim JASIM tarafından hazırlanan **"Diş Çürüklüğü Olan Çocuklardan İzole Edilen *Enterococcus Spp*'nin Adezyon ve Antibiyotik Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi"** adlı tez çalışması 10/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/ oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ

**Eş Danışman** : Dr. Öğr. Üyesi Arwa AL-SHUWAIKH

**Jüri Üyeleri** :

**Başkan** : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji
Çankırı Karatekin Üniversitesi

**Üye** : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji
Gazi Üniversitesi

**Üye** : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Coğrafya
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Diş Çürüklüğü Olan Çocuklardan İzole Edilen *Enterococcus Spp*'nin Adezyon ve Antibiyotik Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca ger eğinin yapılmasını arz ederim (10/02/2023).

**Mustafa Ayad Jasim JASIM**

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİŞ ÇÜRÜKLÜĞÜ OLAN ÇOCUKLARDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS SPP*'NİN ADEZYON VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Mustafa Ayad Jasim JASIM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Arwa AL-SHUWAIKH

Bu çalışma, diş çürüğü ve diş eti iltihabı olan çocuklardan enterokokal bakterilerin izole edilmesi ve teşhis edilmesi, baskın türün belirlenmesi ve bu bakterilerin sahip olduğu bazı virülans faktörlerinin ve bunların bazı antimikrobiyallere karşı ilaç duyarlılıkları üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma, bu cinsin neden olduğu en yaygın enfeksiyon türlerinden birinin *Enterococcus faecalis* olduğunu, bunu sırasıyla *E. faecium, E. gallinarium* ve *E. avium* takip etmiştir. Elde edilen sonuçlar enfeksiyon ile hasta tipi, hastaların yaşı ve hastaların cinsiyeti arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada patogenezinde önemli rol oynayan virülans faktörlerinden enterokok izolatlarının bazı özellikleri hakkında çıkarımlarda bulunulmuştur. Bu izolatların hemolitik enzimi (hemolizin) üretme yeteneği, izolatların çoğunda gama tipi enzimi olarak tespit edilmiştir ve bunu İzolatların beta ile alfa takip etmiştir. Enterokok izolatlarının (12) antibakteriyele karşı ilaç duyarlılığını incelemek için antibiyotik difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Nalidiksik asit (%79,5), siprofloksasin ve amoksisilin artı klavulanik asit (%61,4) karışımına ayrı ayrı duyarlıydılar. İzolatlar ise Rifadin (%36,4), ampisilin (%27,3), metaprim üçlü (%22,7) ve vankomisin (%11,4) gibi diğer antibakteriyellere duyarlılık oranlarında farklılık göstermiştir. İzolatların kullanılan antimikrobiyallere duyarlılığı, hemolitik enzim üretme ve kırmızı kan hücrelerini aglütine etme yeteneklerinden önemli ölçüde etkilenmezken, jelatinaz üretimi ile anti-metaprime (P) duyarlılıkları, beta-laktaz üretimleri ile anti-penisiline duyarlılıkları, biyofilm oluşturma yetenekleri ve bu antijene duyarlılıkları arasında önemli farlılıklar bulunmuştur. Epitel hücrelerine tutunabilme özelliğine sahip ve kapsüler yapıya sahip olan izolatların anti-penisiline duyarlılıkları ayrı ayrı anlamlı farklılık göstermiştir.

**2023, 80 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELER:** E. *faecalis,* E. *faecium*, Diş enfeksiyonu, Antimikrobiyal duyarlılık, Biyofilm üretimi

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

EVALUATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND ADHESION PROPERTIES OF *ENTEROCOCCUS SPP*. ISOLATED FROM CHILDREN WITH DENTAL CARIES

Mustafa Ayad Jasim JASIM

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Arwa AL-SHUWAIKH

This study was carried out to isolate and diagnose enterococcal bacteria from children with dental caries and gingivitis, to determine the dominant species and to determine some virulence factors of these bacteria and their effects on drug susceptibility to some antimicrobials. The study followed that one of the most common types of infections caused by this genus was *Enterococcus faecalis*, followed by *E. faecium*, *E. gallinarium* and *E. avium*, respectively. The results showed that there was no relationship between the infection and the type of patient, the age of the patients and the gender of the patients. In this study, inferences were made about some characteristics of enterococci isolates, which are virulence factors that play an important role in its pathogenesis. The ability of these isolates to produce the hemolytic enzyme (hemolysin) was detected as gamma-type enzyme in most of the isolates, followed by beta and alpha of the isolates. Antibiotic diffusion method was used to examine the drug susceptibility of enterococcal isolates (12) to antibacterial. They were individually sensitive to a mixture of nalidixic acid (79.5%), ciprofloxacin, and amoxicillin plus clavulanic acid (61.4%). The isolates differed in their susceptibility rates to other antibacterials such as Rifadin (36.4%), ampicillin (27.3%), metaprim triple (22.7%) and vancomycin (11.4%). While the susceptibility of the isolates to the antimicrobials used was not significantly affected by their ability to produce hemolytic enzymes and agglutinate red blood cells, there were significant differences between gelatinase production and anti-metaprime (P) susceptibility, beta-lactase production and anti-penicillin susceptibility, biofilm-forming ability and susceptibility to this antigen found. The anti-penicillin susceptibilities of the isolates, which have the ability to attach to epithelial cells and have a capsular structure, differed significantly.



**2023, 80 pages**

**Keywords:** *E. faecalis*, *E. faecium*, Dental infection, Antimicrobial susceptibility, Biofilm production

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu süreçte bilgisini ve ilgisini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Arwa AL-SHUWAIKH'e emekleri için teşekkür ederim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca bu ana kadar bana destek olan babama, anneme ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Mustafa Ayad Jasim JASIM**
**Çankırı, Şubat 2023**

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **i**
**ABSTRACT** ..... **ii**
**ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR** ..... **iii**
**İÇİNDEKİLER** ..... **iv**
**SİMGELER DİZİNİ** ..... **viii**
**KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **ix**
**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **x**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. LİTERATÜR ÖZETİ** ..... **3**
**2.1 İsimlendirme** ..... **3**
**2.2 Habitat** ..... **3**
**2.3 Beslenme Gereksinimi ve Kültürel Özellik** ..... **4**
**2.4 Mikroskobik Özellikler** ..... **6**
**2.5 Enterokok Bakterilerinin Teşhisi** ..... **6**
**2.6 Geleneksel Yöntemlerle Teşhis** ..... **6**
**2.6.1 Serolojik yöntemlerle teşhis** ..... **7**
**2.6.2 Hızlı teşhis** ..... **8**
**2.6.3 Modern yöntemlerle teşhis** ..... **9**
**2.6.4 Cinsin sınıflandırması** ..... **9**
**2.6.5 Enterokokal bakterilerin yeniden sınıflandırılması** ..... **11**
**2.6.6 Virulans faktörleri** ..... **12**
**2.6.7 Hemolitik enzim üretimi: hemolizin** ..... **13**
**2.6.8 Jelatinaz** ..... **14**
**2.6.9 Kapsül** ..... **15**
**2.6.10 Yapışma mekanizmaları** ..... **16**
**2.6.11 Agregasyon maddeleri (AS)** ..... **17**
**2.7 Enterokokal Yüzey Proteinleri (ESP)** ..... **17**
**2.7.1 Yüzey karbonhidratları** ..... **18**
**2.7.2 Diğer uyum mekanizmaları** ..... **18**
**2.8 Biyofilm Oluşumu** ..... **19**

**3. MATERYAL VE METOT ..... 22**
**3.1 Materyal ..... 22**
**3.1.1 Cihaz ve malzemeler ..... 22**
**3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler ..... 22**
**3.1.3 Kültür ortamı ve biyolojik materyaller ..... 23**
**3.1.4 Reaktifler ve boyalar ..... 24**
**3.1.5 Şekerler ..... 24**
**3.1.6 Antimikrobiyal diskler ..... 24**
**3.1.7 Standart suş ..... 25**
**3.2 Yöntem ..... 25**
**3.2.1 Fırında kuru sterilizasyon ..... 25**
**3.2.2 Otoklav ile sterilizasyon ..... 25**
**3.2.3 Filtreleme ile sterilizasyon ..... 26**
**3.3 Kültür ortamı ..... 26**
**3.3.1 Azid kanlı agar ..... 26**
**3.3.2 Kanlı agar ..... 26**
**3.3.3 MacConkey agar ..... 27**
**3.3.4 Beyin-kalp infüzyon suyu (BHIB) ..... 27**
**3.3.5 Beyin-kalp infüzyon agarı (BHIA) ..... 27**
**3.3.6 Üçlü soya agar (TSA) ..... 27**
**3.3.7 Litmus süt ortamı ..... 27**
**3.3.8 Muller-hinton agar ..... 28**
**3.4 Teşhis için Kullanılan Tarımsal Besiyeri ..... 28**
**3.4.1 Tuz toleransı test ortamı ..... 28**
**3.4.2 Alkalin tolerans test ortamı ..... 28**
**3.4.3 Aeskülin hidroliz test ortamı ..... 29**
**3.4.4 Potasyum tellürit tolerans test ortamı ..... 29**
**3.4.5 Şeker fermantasyon test ortamı ..... 29**
**3.4.6 Gliserol fermantasyon test ortamı ..... 30**
**3.4.7 Jelatin sıvılaştırma test ortamı ..... 30**
**3.4.8 Üç eksenli orta test ..... 30**
**3.4.9 Arabinoz ve ksiloz fermantasyon test ortamı ..... 31**

**3.4.10 Hareket testi ortamı ve pigment üretimi....31**
**3.5 Boyaların, Reaktiflerin ve Çözeltilerin Hazırlanması....31**
**3.5.1 Boyalar....31**
**3.5.2 Reaktifler....32**
**3.5.3 Çözeltiler....32**
**3.5.4 Bakteri izolatlarının korunması ve bakımı....35**
**3.6 Numune Toplama....35**
**3.7 Bakteri İzolatlarının Teşhisi....35**
**3.7.1 Kültürel ve morfolojik özellikler....35**
**3.7.2 Mikroskobik inceleme....36**
**3.7.3 Biyokimyasal testler....36**
**3.7.4 Enterokok bakterileri için hizli teşhis yöntemleri....38**
**3.8 Virulans Faktörlerinin Saptanması....39**
**3.8.1 Hemolizin üretiminin saptanması....39**
**3.8.2 Jelatinaz üretiminin saptanması....40**
**3.8.3 Kapsülün tespiti....40**
**3.8.4 Beta-laktaz enziminin saptanması: β-laktamaz üretimi....41**
**3.8.5 Biyofilm oluşumunun tespiti....41**
**3.9 Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Duyarlılık Testi....42**
**3.10İstatistiksel Analiz....43**
**4. BULGULAR VE TARTIŞMA....44**
**4.1 Enterokok İzolatlarının Sınıflandırılması....44**
**4.2 İzole Edilen Enterokok Türlerinin Hastaların Cinsiyetine göre Dağılımı....46**
**4.3 İzole Edilen Enterokok Tiplerinin Hastaların Yaş Gruplarına göre Dağılımı 46**
**4.4 Hasta Tiplerine göre Izole Edilen Enterokok Tiplerinin Dağılımı....47**
**4.5 Enterokok Izolatları için Virülans Faktörleri....49**
**4.5.1 Hemolitik enzim üretimi: hemolizin üretimi....49**
**4.6 Enterokok Türleri Tarafindan Hemolitik Enzim Üretimi....50**
**4.7 Enterokok Türlerine göre Ayrılan Diğer Virülans Faktörleri....51**
**4.8 Enterokok İzolatlarının Antimikrobiyallere Duyarlılığı....53**
**4.9 Enterokokların Biyofilm Oluşumuna ve Antimikrobiyallere Duyarlılığı....55**
**4.10Epitel Hücrelerine Yapışma ve Antimikrobiyallere Karşı Duyarlılık....57**

**4.11Kapsüler Kusurlu Kok İzolatları ve Antimikrobiyallere Duyarlılık ..... 58**
**4.12Enterokok Türleri ve Antimikrobiyallere Duyarlılık..... 59**
**4.13Galatinaz Enziminin Üretimi ve Antimikrobiyallere Duyarlılık..... 60**
**4.14Beta-Laktaz Enziminin Üretimi ve Antimikrobiyallere Duyarlılık ..... 61**
**4.15Enterokokların Biyofilm Oluşumuna ve Antimikrobiyallere Duyarlılığı ..... 62**
**4.16Epitel Hücrelerine Yapışma ve Antimikrobiyallere Duyarlılık..... 63**
**4.17Antimikrobiyallere Alerjik Olanlar Kapsüler Kusurlu Kok İzolatları ..... 64**
**5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 66**
**KAYNAKLAR ..... 68**
**ÖZGEÇMİŞ..... 80**

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| % | Yüzde |
| ± | Artı, eksi |
| °C | Santigrat derece |
| µL | Mikrolitre |
| L | Litre |
| mL | Mililitre |
| nm | Nanometre |

## KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| API | Analitik profil dizini |
| APIRS | Analitik profil indeksi rapid strep |
| AS | Toplama maddeleri |
| BHIA | Beyin kalp infüzyon agarı |
| BHIB | Beyin kalp infüzyon suyu |
| BOS | Beyin omurilik sıvısı |
| CFU | Koloni oluşturan birim |
| CPS | Kapsüler polisakkaritler |
| CYL | Sitolizin |
| EARSS | Avrupa antibiyotik direnci sürveyansı |
| EBP | Endokardit biyofilm pilli |
| ECM | Ekstra hücresel matris |
| ESP | Enterokokal yüzey proteinleri |
| GPI | Gram pozitif tanımlama |
| HYL | Hiyalüronidaz |
| IL | İnterlökin |
| LTA | Lipoteikoik asit |
| MDR | Çoklu ilaç direnci |
| MGP | Glukopiranozit methy-α-D |
| MIC | Minimum inhibitör konsantrasyonu |
| MSU | Orta akış idrar |
| NCCLS | Ulusal laboratuvar standartları komitesi |
| NNIS | Ulusal hastane enfeksiyonu sürveyansı |
| PBP | Penisilin bağlayıcı proteinler |
| PGE | Prostaglandin |
| PMN'ler | Polimorf nükleer hücreler |

# ÇİZELGELER DİZİNİ


Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipman ve malzemeleri ..... 22
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler ..... 23
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültür ortamı ve biyolojik materyaller ..... 23
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan reaktifler ve boyalar ..... 24
Çizelge 3.5 Çalışma sırasında kullanılan şekerler ..... 24
Çizelge 3.6 Çalışma sırasında kullanılan antimikrobiyal diskler ..... 25
Çizelge 4.1 Teşhis edilen Enterokok türlerinin sayıları ve yüzdeleri ..... 44
Çizelge 4.2 Hastaların cinsiyetine göre izole edilen enterokok türleri ..... 46
Çizelge 4.3 Hastaların yaşına göre izole edilen enterokok türleri ..... 47
Çizelge 4.4 Hasta tipine göre izole edilmiş enterokok tipleri ..... 48
Çizelge 4.5 Kusurlu kok üreten hemolitik enzim türlerinin sayıları ve yüzdeleri ..... 49
Çizelge 4.6 Enterokok türleri tarafından hemolitik enzim üretimi ..... 50
Çizelge 4.7 Enterokok türlerine göre ayrılan diğer virülans faktörleri ..... 52
Çizelge 4.8 Enterokok izolat türlerinin antimikrobiyallere duyarlılığı ..... 54
Çizelge 4.9 Enterokokların biyofilm ve antimikrobiyallere duyarlılığı ..... 56
Çizelge 4.10 Epitel hücrelerine yapışma ve antimikrobiyallere karşı duyarlılık arasındaki ilişki ..... 57
Çizelge 4.11 Kapsül bulundurma ve antimikrobiyallere karşı duyarlılık arasındaki ilişki ..... 58
Çizelge 4.12 Enterokok türleri ve antibakteriyellere duyarlılık ..... 59
Çizelge 4.13 Jelatinaz üretimi ile antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki ..... 61
Çizelge 4.14 Beta-laktaz üretimi ile antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki ..... 62
Çizelge 4.15 Enterokokların biyofilm oluşumuna ve antimikrobiyallere duyarlılığı ..... 63
Çizelge 4.16 Epitel hücrelerine yapışma ve antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki ..... 64
Çizelge 4.17 Kapsüle sahip olma ve antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki ..... 65

# 1. GİRİŞ

Enterococcus bakterileri, insan ve hayvanların gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerinde doğal olarak bulunur ve patolojik enfeksiyonlara neden olmaz (Gülhan *et al.* 2006), ancak doğal yaşam alanlarının dışında bulunurlarsa fırsatçı patojenler haline gelirler. İnsanlarda birçok fırsatçı, patolojik enfeksiyonun önemli bir nedenidir (Murray 1990). İdrar yolu enfeksiyonları dahil, endokardit, pelviks boşluk enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, bakteriyemi, karın ve solunum yolu enfeksiyonları ve menenjit gibi az sayıdaki patojenler arasındada yer alır (Moellering 1998). Bu nedenle, bu bakteriler birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve bu durum onları son araştırma ve çalışmalar için birincil hedef haline getirmiştir (Fabretti *et al.* 2006, Theilacker *et al.* 2006).

Bu bakterilerin önemi, yalnızca tehlikeli patolojik enfeksiyonlara neden oldukları için değil, aynı zamanda enfeksiyona neden olmalarına izin veren, konakçı dokulara yapışma, istila etme ve kolonileştirme yeteneğinin gibi benzersiz özelliklere sahip oldukları için de artmıştır. Virülans faktörlerini veya antimikrobiyallere direnci ifade eden genetik genleri konjuge etmek ve değiştirmekte bunlar arasında sayılabilir (Murray 1997). Hemolizin, jelatinaz enziminin üretimi, hücre dışı malzemeye ve konakçı hücrelere çoklu yapışma mekanizmaları, feromonlar, lipoterikoik asit ve bakteriyofaj dahil olmak üzere, Ekstrasellüler süperoksit ve hilouronidaz üretimi de bu bakterilerin sahip olduğu ve ortaya çıkan enfeksiyonlarla ilişkili olabilecek çeşitli virülans faktörleri tanımlanmıştır (Jett *et al.* 1994, Kayaoglu and Ørstavik 2004). Ayrıca izolatlarından bazılarının kapsül oluşturabilme (Huebner *et al.* 2000), β-laktamaz enzimi üretme (Rice 2001) ve pili silyaya sahip olduğu (Nallapareddy *et al.* 2006) bulunmuştur.

Enterokok bakterileri, hücreleri yüzeye tutunduktan sonra, yüksek hücre yoğunluğu, besin maddesi eksikliği ve fiziksel çevresel streslere maruz kalma gibi uygun olmayan koşullara yanıt olarak adaptasyon türlerinden biri olan biyofilmler olarak bilinen karmaşık çok hücreli ve katmanlı yapıları oluşturabilmektedirler (Raad *et al.* 2005, O'Toole *et al.* 2000). Bu bakterilerle in vivo enfeksiyon, intravenöz veya üriner kateterler ve kalp kapakçıkları gibi tıbbi malzemelerin iç yüzeylerinde biyofilm oluşturma

yetenekleriyle bağlantılıdır (Sandoe *et al.* 2003). Biyofilm üreten bakterilerin savunma mekanizmalarının her birine direnci artar. Bu nedenle, bir yandan bubakterilerle önemli bir enfeksiyon kaynağı oluştururken, diğer yandan bu bakterilere ve diğer bakteri türlerine karşı hastanelerde direnç genlerinin yayılmasına katkıda bulunur (Kristich *et al.* 2004, Van Merode *et al.* 2006).

Birçok antimikrobiyale içsel direnç ve artan kazanılmış direnç nedeniyle, enterokok bakterileri antimikrobiyallere karşı çoklu direnç sergiler. Direnç genlerinin türler arasında ve hatta diğer bakteri türlerine aktarılması nedeniyle sağlık kuruluşlarında kalış süreleri ve yüksek tedavi maliyetleri artmıştır (Mundy *et al.* 2000, Hsu *et al.* 2006).

Son yıllarda, anti-vankomisine dirençli enterokok izolatları ortaya çıkarak ilginç bir şekilde, özellikle ciddi hastalıkların (kanser veya kronik) bir sonucu olarak immünsüpresyon riski taşıyan hastalarda ve Dünyada birçok hastanede yoğun bakım ve ameliyatlarda görülmeye başlamıştır. Özellikle bu izolatlar Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri'nde değişen oranlarda daha sık görülmektedir (Bonten *et al.* 2001, Naas *et al.* 2005).

Enterokok bakterileri, nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonların önemli patojenlerinden biridir, bu nedenle bu bakterilerin ve türlerinin araştırılması, neden oldukları enfeksiyonların tıbbi öneminin bilinmesi ve en yaygın patojen türlerinin tanımlanması amacıyla gerekli bir ihtiyaçtır (Prakash *et al.* 2005). Hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *Escherichia coli*'den sonra ikinci en yaygın bakteriyel nedenlerden biri olarak kabul edilen bu bakterilerin hastane kaynaklı vakalardaki önemi (%12) vurgulanmaktadır (Hancock and Gilmore 2006, Desai *et al.* 2001).

Bu bilgiler doğrultusunda, Diş enfeksiyonu olan çocuklarda Enterokok prevalansının belirlenmesi, Enterococci izolatlarının antibiyogram profilinin değerlendirilmesi, Enterococci'nin abiyotik ve biyotik yüzeylere yapışma kabiliyetinin araştırılması, İlaç direnci ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

# 2. LİTERATÜR ÖZETİ

## 2.1 İsimlendirme

Thiercelin ilk olarak 1899'da dışkıda *Diplococci* veya kısa zincirler şeklinde görünen gram-pozitif enterokokları tanımlamak için Fransızca Entérocoque kelimesinden türetilen Enterococci adını kullanmıştır. Araştırmacı ayrıca bu bakterileri enterit, menenjit ve apandisit hastalarından izole etmiştir (Murray 1990). Aynı yıl, Maccalum ve Hansting endokardite neden olan bakterileri fark ettiler ve buna *Micrococcus zymogenes* adını verdiler (Jett *et al.* 1994). Kloroform ve karbolik asit gibi antiseptiklere direncine ek olarak, bu bakteriler daha sonra *Enterococcus faecalis* olarak tanımlandı (Hancock and Gilmore 2006).

1906'da Andrews ve Horder, insan ve hayvanların dışkısında (değişken ve sabit sıcaklık) streptokok buldular ve buna dışkıdan sonra Streptococcus faecalis adını verdiler. 1919'da Oral-Jensen, selefinden farklı fermantasyon özellikleriyle ayrılan benzer bakterilere *S. faecium* adının verilmesini önersede bu isim kabul görmediği için *S. faecalis* adı kullanımda kaldı. 1900'lerin başlarında, bu izolatların yukarıda belirtilen iki hastalık ile enfeksiyonun önemli nedenlerini temsil ettiği belirlenmiş oldu (Murray 1997).

Sonraki araştırma ve çalışmalar Enterococci bakterisine yeni bilgiler ekledi. 1937'de Sherman, bu bakterilerin kapsamını tüm *Streptococcus faecalis*'i dahil etmekten onları *S. faecalis* izolatlarına benzer özellikler gösteren bakterilerle sınırlamaya kadar tanımladığı bir makale yayınladı ve Sherman ve S. Wing, 1919'da yeni bir tür tanımladı. S. *faecium,* ancak daha düşük fermantasyon etkinliği ile Enterococci teriminin farklı tipte özellikler içermektedir (Facklam *et al.* 1997).

## 2.2 Habitat

Enterokok bakterileri insan ve hayvanların bağırsaklarında ve genitoüriner sisteminde kommensal olarak yaşarlar, dolayısıyla iki kanalın doğal florasında bulunur (Prakash *et*

*al.* 2005, Gülhan *et al.* 2006) ve koloniler şeklinde toplanırlar. Sağlıklı deneklerde üst solunum yolu ve safra kanallarında safra yollarında ve vajinada, ayrıca insan ve hayvanların ağız boşluğunda az sayıda bulunur (Desai *et al.* 2001, Zhanel *et al.* 2000). Bazı türleri, özellikle *E. sulfurous* gibi pigmentler üretenler, bazı bitkilerden ekolojik bir merkez alırlar (Tyrrell *et al.* 2002). Doğal merkezlerinde bulunan bu mikroplar patojenik olarak kabul edilmez, ancak insanlar için önemli birçok hastalığa ve enfeksiyona neden olan fırsatçı patojenler haline gelebilirler (Murray 1990).

Enterokok bakterileri toprak, su, süt ürünleri ve çürüyen yiyecekler gibi çeşitli ortamlarda bulunur. Uygun olmayan çevre koşullarına dirençli ve çok sayıda olması nedeniyle yaygın olarak yayılabilmesi ve uzun süre hayatta kalabilmesi nedeniyle, arıtılmamış kanalizasyon veya hayvan atığı ile kirlenmiş ortamlarda sık görülür (Johnston and Jaykus 2004, Naser *et al.* 2005). Ev sineğinin bağırsaklarında 103×3,1 CFU oranında bulunurken (Macovei and Zurek 2006) bir gram insan dışkısındaki tipik konsantrasyonu 108 CFU/G'den fazladır (Huycke *et al.* 1998).

Hastanelerde bol miktarda bulunan enterokok bakterileri, kontamine atık suların bertarafı yoluyla çevreye bulaşmaktadır. Antibakteriyel vankomisine dirençli türleri Avrupa ülkelerinde sırasıyla %36, %71, %17 oranlarında arıtılmış ve arıtılmamış akarsulardan, hayvan atıklarından ve hastane sularından izole edilmiştir (Kühn *et al.* 2005). İsveç'te suyu arıtılmamış akan suda (%60), hastane kanalizasyonunda (%36) ve arıtılmış kanalizasyonda (%19) bu izolatların varlığını kaydetmiştir (Iversen *et al.* 2002). Bu nedenle, enterokok bakterileri, dışkı ile sık sık atılmaları ve uzun süre hayatta kalma yetenekleri nedeniyle dünyanın çoğu ülkesinde suyun fekal kontaminasyonunun göstergesi olarak kabul edilir (Tariq and Hadithi 1993, Manero and Blanch 1999, Collee *et al.* 1989).

## 2.3 Beslenme Gereksinimi ve Kültürel Özellik

Enterokok bakterileri fakültatif anaerobik koşullarda 10-45°C sıcaklık aralığında ürerler ve üremeleri için optimum sıcaklık 37°C'dir (Holt and Krieg 1994, Facklam *et al.* 1997). Bu cinsin sporları, alkali ortamda (pH 9,6), safra tuzlarının konsantrasyonunda (%4),

sodyum klorür konsantrasyonunda (%6,5) ve tetrazolyum tuzlarının konsantrasyonunda (0,1) ve içeren sütte büyüme gibi farklı büyüme koşullarını tolere eder. Aynı zamanda eskülini parçalama kabiliyeti ile de karakterize edilir ve bu nedenle bu malzemeler, büyümelerini teşvik etmek ve diğer mikroorganizmaları inhibe etmek için tarımsal ortamlarda seçici maddeler olarak kullanılır (Facklam and Collins 1989, Murray 1990, Manero and Blanch 1999).

Enterokok bakterilerinin büyümesi, bazik kan akarik besiyerinde düz, dairesel beyaz koloniler şeklinde göründüğü gibi, kültürde ve seçici besiyerinde bulunan kimyasallara bağlıdır; bunların bir bölümü kısmen veya tamamen kanda çözünmüştür ve bunların çoğu analiz edilmemiştir (Collee *et al.* 1989). Maconkey agar besiyerinde, laktoz şekerinin fermantasyonu sonucu yumuşak pembe koloniler şeklinde görünür, bu nedenle bu besiyeri özellikle bu bakterilerin izole edilmesinde ve onları fermente olmayan laktoz ve fermente olmayan bakteri türlerinden ayırt etmek için yararlıdır. Koliformların yanı sıra stafilokokların ve dışkı dışı kokların büyümesini inhibe eder (Treagan and Pulliam 1982). Yumuşak beyaz kolonileri, diğer gram-negatif bakterilerin büyümesini engelleyen sodyum asit içerdiği için bu bakterileri hastalık modellerinden izole etmek için kullanılan sodyum azid besiyerinde zamanla gri renge döner (Huycke *et al.* 1998).

Enterokok bakterileri safra tuzlarının varlığında eskülini degrade eder, bu nedenle safra tuzları içeren eskülin agar besiyerinde siyah koloniler görülürken (0,1) tetrazolyum tuzları içeren besiyerinde kırmızı koloniler görülür ve bazı tiplerin yeteneği nedeniyle potasyum tellürit tuzlarının varlığında gelişirler, bu tuzları (%0,04) içeren ortamda siyah koloniler şeklinde görünürler (Facklam 1972). Türlerinin besiyerinde sarı pigmentler üretme yeteneği ve hareketliliği, *E. casseliflavus* türünün hareketi ve pigment üretmesi nedeniyle değişir (Pompei *et al.* 1991). *E. mudndtii, E. flavescens, E. pallens* türleri ve *E. gillvus* hareketsiz görünür. *E. gallinarium* hareketlidir ve pigment üretmez ve bu cinsin geri kalan türleri her iki özelliğe de sahip değildir (Tyrrell *et al.* 2002).

Enterokok bakterileri, gelişime yardımcı olan sitokrom tiplerini üretmek için ekzojen heminin (varsa) kullanıldığı *E. faecalis* dışında, sitokrom içermedikleri ve Krebs döngüsü ile solunum zincirine sahip olmadıkları için katı fermentörlerdir (Huycke *et al.* 1998). Bu

bakteriler çok çeşitli karbonhidratları ve şekerleri fermente ederek fermantasyon sürecinin son ürünü olarak gazsız laktik asit üretirler ve böylece homofermentasyon yolunu izlerler.

## 2.4 Mikroskobik Özellikler

Enterokokal spor hücreleri gram-pozitiftir, küre- oval bir şekle ve 0,6-2 x 0,6-2,5 μm boyutlara sahiptir. Sıvı besiyerlerinde ve patolojik örneklerde tek tek ve çiftler halinde veya kısa zincirler halinde görünürler ve bazen katı ortamlarda *Bacillus cocci* olarak görünebilirler, izolatlarının bazıları dışında hareketsizdir (Facklam *et al.* 1997, Holt and Krieg 1994). Bazı izolatlar, özellikle kapsül dahil olmak üzere patogeneze sahip olabilir (Huebner *et al.* 1999).

## 2.5 Enterokok Bakterilerinin Teşhisi

Enterokokların tür düzeyinde teşhisi, hastanelerde yayılan baskın ve patojenik enfeksiyon türlerini belirlemek ve antimikrobiyallere karşı farklı ve artan direnç nedeniyle etkili tedaviyi belirlemek için epidemiyolojik çalışmalarda gerekli ve yararlıdır (Facklam *et al.* 1985, Prakash *et al.* 2005).

## 2.6 Geleneksel Yöntemlerle Teşhis

Enterokokal bakterilerin geleneksel teşhisi, fizyolojik testlerin ve serolojik incelemenin yanı sıra kültür ve seçim ortamlarında büyümeleri sırasında mikroskobik ve agronomik özelliklerinin incelenmesine bağlıdır (Iwen *et al.* 1999, Desai *et al.* 2001).

Facklam (1972)'de, o dönemde bilinen ve farklı hastalık modellerinden izole edilen D grubu anti-serum ile reaksiyona giren streptokok türlerini teşhis etmek için bir dizi fiziksel ve biyokimyasal test kullandı. Bu sonuçlara dayanarak, bu türler üç gruba ayrıldı ve S. *bovis* ve S. *equinus*'un bahsedilen serumla reaksiyona girdiği, ancak (%6,5) sodyum klorür içeren ortamlarda yetişememesi nedeniyle tanısal türlerin geri kalanından farklı

olduğu bulundu. Bazik bir ortamta (pH 9,6) yetişenler ise üçüncü grup olarak sınıflandırıldılar.

Ayrı bir cinse yerleştirilmelerine dayanan bu bakterilerin genetik çalışmalarının sonuçlarına bağlı olarak, keşfedilen tiplerinin artması ve insanlar için önemli patojenler olarak ortaya çıkmaları, teşhislerinin önemine olan ihtiyacı artırmıştır (Cetinkaya *et al.* 2000, Naser *et al.* 2005). Gelişimsel değişiklikler yapıldıktan sonra Facklam (1972) sistemine dayalı enterokok tiplerini teşhis etmek için taksonomik bir sistem geliştirildi (Facklam and Collins 1989), çünkü üçüncü grup artık bu cinse ait olmadığı için silindi ve yeni katkı türlerini teşhis etmek için tanı testlerinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıktı. Holt and Krieg (1994) yeni türlerin teşhisi amacıyla başka tanı testleri eklediler, ardından bu sistem Facklam *et al.* (1997) tarafından geliştirildi. Karbonhidratların fenotipik ve fermentatif özelliklerine, asit üretimine ve aynı grup içindeki tiplerin teşhisine bağlı olarak 5 gruba ayrıldı. Sarı pigment üretimi, hareketliliği, piruvat kullanımı, potasyum tellüritin (%0,04) büyümesi ve fermantasyon özellikleri gibi diğer fenotipik özelliklerine dayanmaktadır. Manero and Blanch (1999) enterokok bakterileri için bir teşhis sistemi geliştirdi ve bu sistem fiziksel ve kimyasal birçok test içeriyordu.

### 2.6.1 Serolojik yöntemlerle teşhis

Enterokok bakterilerinin serolojik teşhisi, onu cinsiyet düzeyinde ve streptokokların geri kalanından ayıran özel bir karbonhidrat antijenine sahip olduğundan, antiserumun yüzey antijeni ile etkileşimine bağlıdır (Collee *et al.* 1989). Bu antijen, Lansfield gruplarının D grubunun lipoteikoik asit antijeni (LTA) olarak bilinir. Bu polimer, sitoplazmik zarlarında sabitlenir ve dışarıdan, Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarının ana bileşeni olan Pepteidoglikan tabakasına kadar uzanır (Jawetz 1956, Fabretti *et al.* 2006).

Çalışmalar, bazı enterokok izolatlarının, bu antijeni üreten izolatlarla enfeksiyondan kaynaklanan endokardit ve idrar yolu enfeksiyonu olan hastaların serumu ile etkileşime giren kapsüler polisakarit antijene sahip olduğunu göstermiştir (Xu *et al.* 2000, Hancock *et al.* 2003). Bu izolatların duvarlarının kimyasal analiz sonuçları, bu antijenin iki serotip

ürettiğini göstermiş ve bu antijen tanı ve tedavi için yeni olanaklar sağlamıştır (Huebner *et al.* 2000, Hancock and Gilmor 2002).

*E. faecalis* izolatları, yüzey karbonhidratlarındaki farklılıklara dayalı olarak 11 serotipte sınıflandırıldı. Modern fenotipleme yöntemleri kullanılarak, patolojik numunelerin sınıflandırmasında, izolatlar arasında baskın olan 4 (%72) serotip ile toplamda 21 serotip adlandırıldı (Hancock and Gilmor 2002).

Biyofilm antijenleri olarak bilinen hastalığa neden olan *E. faecalis* izolatlarının ve üç farklı bileşenden oluşan Endokardit ve Biyofilm İlişkili Pili'nin (EBP) yüzeylerine yapışık özel protein yapılarına bağlanan endokardit hastalarının serumlarında da antikorlar bulundu. EBPA-C olarak bilinen proteinler, üç gen (A, B ve C) EBP operonu tarafından üretilir, dolayısıyla EBP antijenleri ile aşılama bu enfeksiyonları önleyebilir veya tedavi edebilir (Nallapareddy *et al.* 2006).

### 2.6.2 Hızlı teşhis

Geleneksel yöntemlerle (tanı sistemleri) teşhisin etkinliğine rağmen, sonuç vermesi uzun zaman alır ve serolojik teşhis, hazır teşhis kitlerinin sağlanmasına bağlıdır (Facklam *et al.* 1985). Bu nedenle, Hanna *et al.* (2002), aşağıdakileri içeren üç eksenli bir test ortamı kullanarak enterokokal bakterilerin hızlı ilk tanısını yapmak ve bunları patolojik diğer Gram pozitif koklardan ayırmak amacıyla hızlı ve kolay bir teşhis yöntemi geliştirmiştir. Bu test, bakteri hareketliliği, oskülin ayrışması ve tuzluluk toleransını içermektedir ve test iki saatlik aşılamadan sonra hızlı sonuçlar vermesiyle karakterize edilir. Hanson and Cartwright (1999), tıbbi açıdan önemli enterokokları teşhis etmek için lenf sütü azaltma, arabinoz ve ksiloz fermantasyonu, boya üretimi, motilite ve Methy-α-D-glukopiranozit (MGP) içeren testlerin bir kombinasyonu ile 4 saatlik aşılamadan sonra hızlı tanısal sonuçlar elde ettiler.

### 2.6.3 Modern yöntemlerle teşhis

Bakteriyosin üretimi ve faj tiplendirmesi enterokok bakterilerinin izolatları arasındaki farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır, ancak diğer yandan hastanelerde dirençli izolatların ortaya çıkışının artması ve diğer yandan reaktiflerin bulunmaması nedeniyle uygulanması zordur. Bu nedenle dikkatler ileri moleküler yöntemlere doğru ilerlemiştir (Facklam *et al.* 1997).

Moleküler yöntemlerle teşhis, hücre proteinlerini ve hücre duvarını ayırmak için elektro-göç tekniği dahil olmak üzere çeşitli tekniklere bağlıdır. Nükleik asitlerin hibridizasyonu, DNA analizi, glikopeptidlere dirençli genlerin amplifikasyonu, bu genlerin duplikasyondan sonra kesilmesi ve daha sonra analiz edilmesi gibi modern genetik teknikler bulunmaktadır (Naser *et al.* 2005, Novais *et al.* 2005). DNA için PCR tekniği, enterokokların hızlı ve doğru teşhisinde kullanılmaktadır (Dutka-Malen *et al.* 1995). Bu teknik epidemiyolojik çalışmalarda bu cinsin yaygın türlerini belirlemek ve bu bakterilerin sahip olduğu antimikrobiyal direnç genlerini, vankomisine direnç fenotiplerini ve virülans faktörleri genlerini taşıyan patojenik izolatları belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Leavis *et al.* 2006).

### 2.6.4 Cinsin sınıflandırması

1933'te bilim adamı Lancefield, streptokokları sınıflandırmak için hücre duvarlarındaki karbonhidratların kimyasal yapısının incelenmesine dayanan ve onları bölmek için İngiliz alfabesini kullanan D grubu antiserum ile serolojik bir sistem önerdi (Jawetz 1956).

Sherman tarafından 1973'te geliştirilen sınıflandırma sistemine gelince, streptokokları Piyojenik, Laktik, Viridanlar ve Enterokoklar olmak üzere dört kategoriye ayırdı. Enterokoklar, 10°C-45°C sıcaklıklarda ve (%6,5) sodyum klorür konsantrasyonunda yaşayan bakteriler olarak tanımlanır. Alkali bir ortamda (pH 9,6), eskülini bozma ve safra tuzlarının varlığında büyüme yeteneğine sahiptir ve yüzey antijenleri, Enterokokları ve enterokokal olmayan Streptokokları ayırt etmek için bu özellikleri kullanarak Lansfield

gruplarının D grubunun antiserumu ile etkileşime girer (Sch86). Bu tipler arasındaki benzerliklerin varlığının bir sonucu olarak, hemoliz ve jelatinin özelliklerine göre aşağıdaki gibi daha doğru bir isimlendirme önermiştir.

- *S. faecalis* hemoliz ve jelatinizasyon için negatiftir.
- *S. faecalis* var. *liquefaciens* hemoliz için negatif ve jelatinizasyon için pozitiftir.
- *S. faecalis* var. *haemolyticus* hemoliz için pozitif ve jelatinizasyon için negatiftir.
- *S. duran S. faecalis* var. *zymogenes* hemoliz ve jelatinizasyon için pozitiftir (Facklam *et al.* 1997).

Yirminci yüzyılın kırklı ve ellili yıllarında, Oral-Jensen tarafından tanımlanan türlerin, tetrazolyumun indirgenmemesi ve potasyum tellerit (PT) tarafından inhibisyon gibi biyokimyasal özellikleri bakımından *S. faecalis*'ten farklı olduğu bulunmuştur. 1957 Berge Ansiklopedisi'nde ayrı bir tür olarak tanınmayan *S. faecium* tanımına geri dönmesini sağlayarak, bu enterokok türlerine ek olarak, bakterilerin başka türleri de farklı insan, hayvan, gıda ve bitki modellerinden izole edilmiştir. Hareketli türler 1935'ten beri gözlemlendi ve *S. faecium* subsp. *mobili* olarak bilinen ve sarı pigment üreten türler 1950'de *S. faecium* var. *casselifavus* olarak adlandırıldı. 1955'te peynirden yeni bir enterokok bakterisi izole edildi ve *S. malodoratus* adı verildi (Murray 1990).

1960'larda, üç terimin (*Faecal Streptococci,* Group D *Streptococci, Enterococci*) artık daha önce anlaşıldığı gibi tek bir anlama sahip eşanlamlı isimleri temsil etmediği anlaşıldı. İlk terim olan Fekal Streptokoklar, kökeni dışkı olan farklı streptokok türlerini tanımlamak için kullanılmış ve tanımlayıcı bir amaç vermediği için kullanılmamasını önermiştir. İkincisi ise Lansfield gruplarından D grubu antiserum ile reaksiyona giren ve ayırt edici özelliklere sahip enterokok grubunu, son terim ise antiserum ile pozitif reaksiyon veren rosococci grubunu tanımlamak için kullanılmıştır. D grubu antiserum, ancak özellikleri enterokoklardan farklıdır, bu nedenle bağırsak dışı *rosococcus* olarak adlandırılırlar. Bunlar *S. bovis* ve *S. equinus*'u içeriyordu (Facklam 1972).

1967'de enterokok bakterileri ile benzer özelliklere sahip bazı izolatlar tanımlanmış, ancak Lancefield gruplarından Q grubu antiserum ve D grubu antiserum ile pozitif reaksiyon vermişlerdir. Bu izolatlar insan dışkısından ve endotermik hayvanlardan, özellikle *S. avium* olarak adlandırılan tavuklardan izole edilmiştir.

### 2.6.5 Enterokokal bakterilerin yeniden sınıflandırılması

Yirminci yüzyılın seksenlerinde, önemli taksonomik gelişmeleri beraberinde getiren genetik yöntem ve teknikler kullanıldı. Farrow and Collins (1984), söz konusu türleri birbirinden ayıran DNA hibrodizasyonu ve biyokimyasal özellikleri ile ilgili çalışmaların sonuçlarını yayınladı. Ayrıca bazı enterokok izolatlarının D grubuna sahip olduğu ve dışkıdan izole edildiği bulunmuştur. Tavuklarda tespit edilen *S. avium*'dan farklı olduğundan *S. gallinarum* olarak adlandırıldı (Murray 1990). Kilpper-Bälz and Schleifer (1987) tarafından sunulan DNA ve RNA hibridizasyonu ile yağ asitleri ve penisilinlere direnç çalışmalarının sonuçları, *S. faecalis* ve *S. faecium* türlerinin *Streptococci* cinsinden farklı olduğunu ve bu bilginin bir radikale neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle araştırmacılar onu *Enterococci* olarak bilinen ayrı bir cinse aktarmayı önerdiler. Bu isim daha önce kullanılmış olmasına rağmen araştırmacılar bu sonuçlara ulaşana kadar kullanılmamış ve kullanımı daha kabul edilebilir hale gelmiştir (Manero and Blanch 1999).

Bu sonuçlara göre Enterococci bakterileri, Enterococci adı verilen ayrı bir cinse yerleştirilmiş ve daha önce Streptococci cinsi içinde bilinen benzer özelliklere sahip türler bu cinse aktarılmış ve böylece Enterococci adı bir önceki cinsin adının yerini almıştır (Murray 1997, Cetinkaya *et al.* 2000). Enterococcus cinsi artık Enterococcaceae familyasında sınıflandırılmaktadır. *E. avium*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis* ve *E. faecium*, *E. gallinarium*, *E. hirae*, *E. mudndtii*, *E. malooratus*, *E. psedoavium*, *E. raffiniosus*, *E. solitarius* olmak üzere 12 tür içerir bu cinse daha sonra yeni türler eklenmiştir (Facklam and Collins 1989).

Holt and Krieg (1994), *E. dispar*, *E. cecorum*, *E. saccharolyticus* ve *E. seriolicida* olmak üzere 4 yeni türler eklemiştir. Bazı kişisel özelliklere bağlı olarak, 1998'de molekül

dizisine (16s rRNA) dayalı, *E. columbe* türü eklendi. *E. flavescens* ve *E. sulfurous* türleri ise sayısı 2000 yılına kadar sabit kalan cinse son eklenen türlerdendi (Baron *et al.* 2003, Mundy *et al.* 2000).

Teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi sonucunda, *E. gillvus* ve *E. pallens* dahil olmak üzere Enterococcus cinsine ait diğer yeni türler izole edilmiştir. 2002 yılında bu cins tarımsal, biyokimyasal, patolojik ve genetik özelliklerde 21 farklı tür içermektedir (Tyrrell *et al.* 2002). 2003 yılında farklı kaynaklardan 5 yeni tür daha izole edilmiştir: *E. hemoperoxidus, E. moraviensis, E. porcinus, E. raati, E. villorum*. Böylece cins toplamda 26 tür sayısına sahip olmuştur (Semedo *et al.* 2003). Bunlara ek olarak, proteinlerin elektro-göç teknikleri ve nükleik asitlerin hibridizasyonu da dahil olmak üzere genetik teknikler gibi modern teknolojilerin kullanılması sayesinde, sitozin ve guanin yüzdesi olarak bilinen DNA'daki azotlu bazların bileşimi bilgisi (C+G%) ve polimeraz zincir reaksiyonu tekniği (PCR) kullanılarak nükleik asitlerin azotlu bazlarının dizisinin belirlenmesi ve ayrıca 16s rRNA ve tRNA molekülü için bu bazların dizisinin belirlenmesi, yani *E. casin, E. hermanniesis, E. italicus* ve *E. deviresei* dahil olmak üzere yeni türler eklenmiştir (Naser *et al.* 2005). Farklı hayvan kaynaklarından ve deniz suyundan izole edilmiş *E. aquimarimus*, 2005'teki sayıyı 31 türe çıkarmıştır. Her ikisi de böcek bağırsağından izole edilen *E. termitis* ve *E. silesiacus* ve sağlıklı insanların dışkısından izole edilen *E. aceae* dahil olmak üzere üç yeni tür tanımlandı ve Enterococcus cinsinin sayısı 2006 yılına kadar 34 türe ulaşmıştır (Carvalho *et al.* 2006).

### 2.6.6 Virulans faktörleri

Enterokok bakterileri, probiyotik olarak süt endüstrisinde, tatlarının üretilmesinde ve geliştirilmesinde önemli rol oynadıkları, bağırsaklarda bulunan mikroorganizmaları dengelemek amacıyla ve insan ve hayvanlarda gastroenterit tedavisinde ve Gıda kontaminasyonuna neden olan Listeria bakterisine karşı bakteriyosin üretme amacıyla kullanılmaktadır. Virulans faktörlerine yönelik genlere sahip olması ve izolatları arasında bulaşabilecek antimikrobiyallere karşı direnci nedeniyle insan sağlığı için bir tehdittir (Eaton and Gasson 2001, Hancock and Perego 2002).

Enterokok bakterileri tarafından üretilen çeşitli virülans faktörleri tanımlanmıştır ve bu alandaki çalışmalar halen devam etmektedir. Belirlenen faktörler; hemolizin enzimi, jelatinaz enzimi, farklı adezyon mekanizmaları, feromonlar, lipokiyoik asit, süper bakteriyosinler, bakteriyosinler, Ekstraselüler süperoksit ve hiyalüronidaz üretimi (Jett *et al.* 1994, Kayaoglu and Ørstavik 2004), kapsül (Huebner *et al.* 2000), β-laktamaz enzimi (Cetinkaya *et al.* 2000) ve silia Pili (Nallapareddy *et al.* 2006) olarak sıralanabilir.

### 2.6.7 Hemolitik enzim üretimi: hemolizin

Todd (1934)'un çalışması, enterokok bakterileri için virülans faktörlerinde uzmanlaşmış hemolitik enzim üzerine yapılan çalışmaların ilkidir, çünkü izolatlarının bir kısmı at kanı agar besiyerinde sıvı ortam olmadan bu besiyerinde berrak çözelti alanları oluşturarak hemolizin üretir. İnsan, at, tavşan ve inek kanından hazırlanan agar besiyerlerinde mikroorganizmaların teşhis laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan koyun kanından hazırlanan kanlı agarları parçalamaz, bu da hemolizini bu bakterilerin belirsiz bir özelliği haline getirir (Jett *et al.* 1994).

Bu bakteriler tarafından üretilen hemolizin, toksin ve bakteriyosin etkinliğine sahiptir. Enfekte olmuş ökaryotik hücrelere zarar vermek için çalışır ve bakteriyosin, çok çeşitli Gram-pozitif bakterilere karşı etkili bir merkezdir, bu nedenle prokaryotik hücrelere karşı etkinliği nedeniyle sitolizin olarak bilinir (Budzik and Schneewind 2006, Gülhan *et al.* 2006).

Laboratuvar hayvanlarında yapılan birkaç deney, hemolizin üreten izolatların, endokardit ve optik zarların iltihaplanması durumlarında üretimini kodlayan genlerin kaybıyla üretilmemesinden veya mutasyona uğramasından daha öldürücü olduğu bulunduğundan, bu bakterilerin patogenezindeki hemolizin rolünü göstermiştir (Jett *et al.* 1992, Chow *et al.* 1993). Farelerin periton zarı yaralanmalarında hemolitik izolatların öldürücü dozunun (%50) hemolitik olmayan izolatlardan 10 kat daha fazla olduğu da kaydedilmiştir (Mundy *et al.* 2000).

Gentamisin antijenine dirençli *E. faecalis* izolatlarından hemolizin üretimi, hastane içi bakteriyemi vakalarında, söz konusu antijene duyarlı, üretken olmayan izolatlara kıyasla 3 hafta içinde ani ölüm riskinde beş kat artışa neden olmaktadır (Huycke *et al.* 1991). Hemolizin üretme özelliği, sağlıklı insanların dışkı izolatlarına göre patolojik izolatlar arasında yaygındır ve üreten izolatlar antimikrobiyallere enzim üretmeyen izolatlara göre çoklu direnç gösterir (Ike *et al.* 1987, Inoue *et al.* 2006).

Hemolizin, eritrositleri, polimorf nükleer hücreleri (PMN'ler) ve makrofajları parçalayan ve böylece doğrudan doku hasarına katkıda bulunan sitolitik etkisi ile enterokok patogenezinin artmasına katkıda bulunur (Kayaoglu and Ørstavik 2004). Hemolizin bazen kromozomal olarak kodlanmış bir fenotipik özelliktir ve sıklıkla, parçalanmış izolatlardan parçalanmayan izolatlara transfer olma yeteneğine sahip olan, PAD1 olarak bilinen oldukça spesifik bir feromon üreten plazmit tarafından kodlanır (Ike *et al.* 1984).

### 2.6.8 Jelatinaz

Bleiweis and Zimmerman (1964), ilk kez *E. faecalis* izolatlarının hücre dışı çinko-peptitlerinden oluşan bir proteolitik enzimi tanımlamıştır. Makinen and Makinen (1994), *E. faecalis* izolatlarındaki jelatin, kollajen, insülin, kazein, azocoll, hemoglobin, fibrinojen, cinsel feromonlarla ilgili peptidleri ve birçok aktif peptidi parçalama yeteneğine atıfta bulunarak bu enzime galatinaz adını vermeyi önermiştir (Kayaoglu and Ørstavik 2004). Laboratuar hayvanlarında yapılan deneylerin çoğu, bu faktörü üreten izolatların jelatin ayrışmasına ve diş nekrozuna neden olduğu ve jelatin ve hemolizin üreten izolatların piyelonefrite neden olurken, jelin enterokokal bakterilerin virülansında jelin rolünü üstlendiğini göstermiştir (Jett *et al.* 1994).

Jelatin, enterokokların insan bağırsak hücrelerinden geçmesine yardımcı olan, böylece doğal olarak bulunmadığı alanlarda infiltrasyonu ve çoğalmayı artıran önemli bir faktördür. Farklı hastalık modellerinden izole edilen *E. faecalis* izolatları, ex vivo bağırsak hücrelerinin kültürlerinde bulaşan üretken olmayan (%25) izolatlara kıyasla %63 oranında bulaştırma kabiliyetini göstermiştir. Jelatin, yüzey proteinlerinin yanlış katlanmış bölünmesi üzerinde çalışarak fibrin izolatların süpernatant feromon

seviyelerini düşürmekte ve ayrıca otoliz sürecine katkıda bulunarak üretilen izolatların zincir uzunluğunu belirlemektedir (Zeng *et al.* 2005).

Genetik çalışmalar, Jelatin üretimini kodlayan kromozomal genin varlığı ekspresyonu ile ilişkili olmadığı, ancak FSR'nin düzenleyici lokuslarının kontrolü altında olduğu için, Jelatin'in bu bakteriler için üretimi ve aktivitesinin diploid sisteme tabi olduğunu göstermiştir. 3 FSR (A, B, C) genlerinden oluşan operon sistemi, proteolitik enzimlerin üretimini kontrol eden düzenleyici proteinlerin üretiminden sorumludur (Hancock and Perego 2004). Ayrıca tüm hastalıklı *E. faecalis* izolatlarının, bu izolatlarda FSR'nin düzenleyici proteinlerinin üretimi için kodlanan segmentin kaybı nedeniyle Jelatin üretim oranının %60-62 arasında olduğu jelatin genine sahip olduğu da kaydedildi (Mohamed and Murray 2005). Çalışmalar, Jelatin izolatlarının üretimini düzenleyen FSR operonunun bu bakterilerin biyofilm oluşumuna katkıda bulunmasının önemini göstermiştir, çünkü mutasyona uğramış izolatların FSR'yi silerek, mutajenik olmayan izolatlara kıyasla canlı zar oluşumunu etkilediği bulunmuştur (Carniol and Gilmore 2004). %27 oranında dışkı izolatlarında bulunmaktadır ve bu, doğrudan doku hasarına yol açması nedeniyle bu faktörün virülanslarındaki rolünü doğrulamaktadır (Hancock and Gilmore 2006).

### 2.6.9 Kapsül

Kapsüler polisakkarit (CPS) kapsüller, birçok patojenik mikroorganizma için önemli virülans faktörleridir. Elektron mikroskobu kullanan çalışmalar, patojenik enterokokların birçok izolatında, onların konakçıya müdahale etmelerine ve hayatta kalmalarına yardımcı olan ve fagositoz sürecine direnmelerini sağlayan konservelerin varlığını göstermiştir (Hsu *et al.* 2006, Hancock and Gilmore 2006). CPS'nin antijenik karakter sergilediği de kanıtlanmıştır, çünkü laboratuvar hayvanlarını onları üreten bu mikropların izolatları ile aşılamak, sayılarını azaltmaya ve onları öldürme sürecinde aracılık eden antikor oranını artırmaya çalışır, böylece bu antijen önleyici ve terapötik bir etki sağlayabilir (Huebner *et al.* 2000).

Huebner *et al.* (1999), patojenik *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının, fagositoz sürecini hızlandırmak için opsonizasyon sürecinin hedefleri olan CPS antijenlerine sahip olduğunu ve dolayısıyla bunların aşıların hazırlanmasında kullanılma olasılığını doğrulamıştır. Çalışmanın gösterdiği gibi, antijen üreten izolatların neden olduğu enfeksiyonları önlemek için, bu tip antijenin kimyasal yapısı, glikozun ikinci karbon atomunun bağının bir grup -2-1-D-glukoz α ile yer değiştirmesiyle LTA antijenine bağlanır. Bu türün üretimi için gerekli proteinler, epa olarak bilinen bir grup genden kodlanarak ve bu operonun klonlanmasıyla yapılır ve *E. faecalis* izolatlarından *E. coli*'ye aktarılarak aynı antijeni üreten gen ifadesine maruz kalır. Bu antijenin, antijen üreten izolatların neden olduğu endokarditli hastaların serumunda bulunan antikorlarla da etkileşime girdiği bulunmuştur (Xu *et al.* 2000).

Hancock and Gilmore (2002), vankomisine dirençli ve Galaktoz-gliserol-teikoik asitten oluşan birçok izolatta CPS antijen serotip II'yi tanımlamaktadır. Ayrıca, üretimini kodlayan ve cap2 olarak bilinen operon tespit edilmiştir. AK dizili genlerden oluşur ve bu operona inaktif genlerin dahil edilmesi, bu tip CPS antijenleri ile antikor etkileşiminin kaybına yol açar, fagositoz süreci enfeksiyon bölgesinde bulunan mutasyona uğramış izolatların sayısını azaltır ve yayılma hızını artırır (Hancock *et al.* 2003).

### 2.6.10 Yapışma mekanizmaları

Su ve hücre yüzey yükü için yüzey afinitesi dahil olmak üzere enterokok bakterilerinin yüzey özellikleri, hidrofobik etkileşimlere katkıda bulunarak yapışma sürecini artıran konakçı hücrelere yapışmayı sağlar (Waar *et al.* 2002). Enterokokal bakterilerin konakçı hücrelerin yüzeylerine yapışma süreci, deri ve mukoz membranlar gibi özelleşmemiş bağışıklık faktörlerinin konakçıya nüfuz etmesinden ve ardından epitelyal ve endotelyal hücrelere yapışmasından sonra enfeksiyona neden olmak için önemli bir adım olarak kabul edilir. Akyuvarlar ve hücreler arası materyal enfeksiyona neden olur (Jett *et al.* 1994, Hancock and Gilmore 2006).

### 2.6.11 Agregasyon maddeleri (AS)

Adezyon sürecine aracılık eden ve enterokokal bakterilerin ökaryotik hücrelerle kolonizasyonuna izin veren yüzey proteinleridir. Bu proteinler, feromon üreten plazmitler tarafından kodlanır ve plazmitlerin donör hücreden alıcı hücreye transferine yardımcı olur ve renal epitel hücrelerinde eşleştirilmiş izolatların bakteriyel düzeneklerinin oluşumuna katkıda bulunur (Wells *et al.* 2000, Shepard and Gilmore 2002).

AS üreten izolatların, öldürme sürecini durdururken fagositik hücrelerin içinde kalarak veya süperoksit üretimi de dahil olmak üzere PMN'lerin fonksiyonlarını inhibe ederek kendilerini nötrofillerin savunmasından korudukları için, üretmeyen izolatlara kıyasla konakçı savunmalarına dirençli oldukları bulunmuştur. Dışkı izolatlarına kıyasla patolojik izolatlar arasında AS üretimi artmaktadır (Hirt *et al.* 2002, Kayaoglu and Ørstavik 2004). Enterococcus bakterisinin laktobasil hücrelerine adezyonu Moieties teorisine göre AS peptit dizilerini analiz ederek açıklanmaktadır. Feromon üreten plazmitlerde bulunan genler tarafından üretilir, bu da üretici izolatlara doğrudan konakçı hücrelerin yüzeylerinde bulunan tamamlayıcı reseptörler Integrin ile yapışma ve girişim özelliklerini verir (Jett *et al.* 1998, Waters *et al.* 2003).

## 2.7 Enterokokal Yüzey Proteinleri (ESP)

Enterokok bakterileri, yaklaşık 202 kDa'lık yüksek moleküler ağırlığa sahip ve 1873 amino asitten ve bu asitlerin yaklaşık 50-743 N-terminalini taşıyandan oluşan farklı yüzey proteinleri üretir. ESP, kendisine benzersiz bir yapı kazandıran ESP olarak bilinen bir kromozomal genin kodlanmasıyla üretilir. Adezyon süreci için gerekli olan konak reseptörlerine bağlanmada yer alan birimlerin kopyalanması ile işaretlenir. ESP, bağışıklık sisteminin işlevlerini baskılamaya katkıda bulunur ve ESP, patojenik izolatların çoğunda bulunur, bu nedenle bu bakteriler için bir virülans faktörü olarak kabul edilir (Shankar *et al.* 1999, Raad *et al.* 2005).

Shankar *et al.* (2001) çalışması, ESP'nin idrar yolunda *E. faecalis* izolatlarının varlığına ve kolonizasyonuna katkıda bulunduğunu göstermiştir. ESP geni, *E. faecium* (%40,1) ve *E. faecalis* (%100) zolatlarında ve bakteriyemi olgularından izole edilen *E. raffinosus* izolatlarında (%51,7) bulunduğu gibi, enterokokal bakteri izolatları arasında %23-68 arasında değişen bir yüzde ile yayılmaktadır. Bu genin varlığı, vankomisin antikoruna dirençli izolatların yayılmasına kısmen katkıda bulunduğundan, izolatların epidemiyolojisi ile ilişkilidir (Harrington *et al.* 2004). ESP geninin varlığı, *E. faecium* izolatları arasında, prevalans oranlarının sırasıyla %71 ve %60 kaydedildiği farklı hastalık modellerinden iki *E. faecalis* izolatına kıyasla artmaktadır (Duprè *et al.* 2003). Ayrıca, Toledo-Arana *et al.* (2001) çalışmalarında biyofilm oluşumunun, *E. faecalis* izolatlarında ESP geninin varlığıyla bağlantılı olduğunu bulmuşlardır.

### 2.7.1 Yüzey karbonhidratları

D-manose, D-glikoz, L-fucise ve D-galaktozu içeren bu kompleks yüzey karbonhidratları, enterokok bakterilerinin insan kalp hücrelerine ve idrar epitel hücrelerine yapışmasını sağlar (Jett *et al.* 1994). Birkaç çalışma, *Enterococci* bakterisinin hücre duvarında bulunan karbonhidrat antijeninin (LTA), onların farklı konakçı hücrelere yapışmasına aracılık ettiğini doğrulamıştır (Hancock and Gilmore 2006, Kayaoglu and Ørstavik 2004, Fabretti *et al.* 2006).

### 2.7.2 Diğer uyum mekanizmaları

Enterokoklar, kan pıhtılaştırıcıları (fibrin, fibronektin, fibrinojen), vitronektin ve laktoferrin dahil olmak üzere serum proteinlerine ve hücre dışı matris (ECM) proteinlerine geçebilir ve bunlara bağlanabilir (Shankar *et al.* 1999). *E. faecalis* izolatlarının, bu izolatların ECM proteinlerine spesifik yapışmasına aracılık eden Adhezyon kolajen (ACE) proteinleri ürettiği gösterilmiştir. ACE, ACE genini kodlar ve bu genin mutasyona uğramış izolatları, mutasyona uğramamış izolatlara göre özelleşmiş proteinlere daha az tutunur (Nallapareddy *et al.* 2000).

Bazı enterokok izolatları, EFA A geni tarafından kodlanan ve farklı kaynaklardan (patolojik, patolojik olmayan, çevresel, beslenme) izole edilen *E. faecalis* izolatlarında yaygın olan bir protein yapısı olan endokardit antijeni EFA A üretir. Proteinler, streptokok bakterileri tarafından üretilen adezyon proteinlerine benzer (Shepard and Gilmore 2002, Creti *et al.* 2004). EFA A, kendisini üreten izolatların konakçı hücrelere yapışmasını sağlayan yapışkan bir maddedir. Bu nedenle, *E. faecalis* izolatları arasında EFA A geninin varlığı, adezyonunu ve dolayısıyla deney hayvanlarında endokarditte patojenitesini arttırmaktadır (Eaton and Gasson 2001). Duprè *et al.* (2003) çalışması, birçok hastalık modelinden elde edilen *E. faecalis* izolatlarında ACE ve EFA A genlerinin varlığını sırasıyla (%60) ve (%86) oranında tespit etmiştir.

Kırmızı kan hücrelerinin aglütinasyonu, enterokok bakterilerinin konakçı hücrelere bağlanmasına yardımcı olan mekanizmalardan biridir. *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının insan kırmızı kan hücrelerini sırasıyla %37 ve %9 oranında aglütine edebildiği saptanmıştır. Ayrıca atların ve ineklerin her biri için sırasıyla %12,5 ve %3,6 kırmızı kan hücreleri ile aglütinasyon vardır (Gülhan *et al.* 2006). Son çalışmalar, enterokok bakterilerinin pili adı verilen, konakçı hücrelere yapışmalarına yardımcı olan ve ayrıca endokardit ve biyofilm oluşumunda önemli bir role sahip olan protein fibrillerinden oluşan yüzey yapılarının varlığını doğrulamıştır (Budzik and Schneewind 2006, Nallapareddy *et al.* 2006).

## 2.8 Biyofilm Oluşumu

Biyofilmler, yüzeylere yapışan çok hücreli yapılar oluşturan tek hücreli mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanır ve bunların oluşumu, yüksek hücre yoğunluğu, besin eksikliği ve fiziksel çevresel streslere maruz kalma gibi çevresel nedenlerin bir sonucu olarak gerçekleşir (O'Toole *et al.* 2000, Watnick and Kolter 2000).

Biyofilmlerin oluşumu, birkaç yüz büyüyen hücreden oluşan küçük koloniler halinde büyümesi için bir substrat oluşturmak üzere tek bir eşey hücresinin yüzeye yapışmasını gerektirir (Jawetz 1956, Van Merode *et al.* 2006). Biyofilmlerin iç ortamları, besinlerin varlığına ve diğer çevresel koşullara göre büyük farklılıklar gösterir. Ekolojik

merkezlerdeki bu çeşitlilik, belirli bir türün suşlarının iş birliği içinde bir arada var olduğu bir biyofilm kompleksinin üretimi için önemli bir koşuldur (Kreft and Wimpenny 2001). Bu farklı merkezler içinde, metabolizma ve replikasyon hızlarında geniş bir çeşitlilik sergilerler (Sternberg *et al.* 1999).

Mantarlar ve patojenik bakteriler, ana damarların ve idrar yollarının kateterizasyonu için kullanılan kateterler, yapay kalp kapakçıkları ve yedek eklemler gibi çeşitli tıbbi malzemelerin yüzeylerinde biyofilm oluşturabilmektedir, bu nedenle bu durumlarda uzun süre tedavi önerilmektedir (Donlan 2001, Xiang 2004). Ayrıca enterokok bakterileri dişlerin kök kanallarında, karaciğerin safra kanallarında ve birçok farklı biyolojik maddede üretebilmektedir (Mohamed and Murray 2005, Waar *et al.* 2002).

Biyo-membran üreten hücreler, biyofilmin biyositlerin etkinliğini hariç tutmasını sağladığından ve belirli bir gruba karşı uzmanlaşabileceğinden, antimikrobiyallere çoklu direnç dahil olmak üzere bakterinin tek planktonik hücresinden farklı farklı özellikleri açıkça ifade etme yeteneğine sahiptir. Antimikrobiyallerin, bu nedenle fenotipik bir özellik olarak görünür (Mah and O'Toole 2001). Aynı zamanda konakçı savunma mekanizmaları üreten izolatların direncini arttırır. Bu nedenle, biyofilmler birçok hasta için sürekli bir enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadır ve mikroorganizmalarla, özellikle bakteriyel enfeksiyonlarla enfekte olan hastalar için ayırt ediciliklerinin arttırılması önemli bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir (Costerton *et al.* 1999).

Ana damarların kateterizasyonundan kaynaklanan bakteriyemiye neden olan patojenik *E. faecium* izolatlarının fekal izolatlardan daha fazla biyofilm ürettiği ve direncinin bulunduğu çeşitli araştırmalar, enterokok bakterilerinin in vitro dışında biyofilm oluşturma yeteneğini göstermiştir (Kristich *et al.* 2004, Raad *et al.* 2005). Bu bakterilerin izolatlarından kaynaklanan oldukça tehlikeli patolojik enfeksiyonlar, canlı vücudunun dışında ve çeşitli tıbbi malzemelerin yüzeylerinde biyofilm üretimiyle bağlantılıdır. Kateterizasyon işlemine bağlı olarak bakteriyemiye neden olan *E. faecalis* izolatlarının ve endokardit vakalarının diğer enfeksiyonlara neden olan izolatlara göre daha fazla biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (Sandoe *et al.* 2003, Mohamed and Murray 2005).

Enterokokal bakterilerde biyofilm oluşumunun yorumlanması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Toledo-Arana *et al.* (2001), ESP proteinlerinin *E. faecalis* izolatları için oluşumunda gerekli olduğunu vurgulamıştır. Bununla birlikte, bu bakterilerin izolatları, ESP üretimini kodlayan ESP genini kaybetmesine rağmen biyofilm üretebildiğinden, diğer çalışmalar bunu doğrulamamıştır (Udo *et al.* 2003, Ramadhan and Hegedus 2005).

Diğer çalışmalar, izolatların FSR ve Jel'i silerek mutasyona uğradığı bulunduğundan, FSR düzenleyici grubun genlerinin ve Jel üretimini kodlayan jel geninin varlığının, *E. faecalis* izolatlarında biyofilm üretmek için birbirine bağlandığını gösterdi (Hancock and Perego 2004, Carniol and Gilmore 2004). Her durumda, farklı hastalık modellerinden bazı *E. faecalis* izolatları için jel üretimi ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki olmadığı kanıtlanmıştır (Mohamed and Murray 2005).

Biyofilm oluşumuna ESP ve jelin kısmi katkısına rağmen, oluşumundan esas olarak sorumlu olan mekanizmalar veya genetik belirleyiciler tanımlanmamıştır. Her durumda, *E. faecalis* heterotrofik izolatlarının biyofilm ürettiği tespit edildiğinden, hücrenin yüzey yükünün, biyofilmi üretmek için gelişebilen bakteri hücresinin kolonizasyonunda ve yapışmasında önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (Van Merode *et al.* 2006). LTA molekülünde bulunan alanin ester grubunun silinmesinin, mutajenik olmayan doğal izolatlara kıyasla bu izolatlar için biyofilm oluşumunda artışa yol açtığı da bulunmuştur (Fabretti *et al.* 2006).

Bazı Enterokok bakterileri, tek yüzey proteinlerinin (hücre tarafından üretilen) karboksilik grubunun C-terminal ucunu, kılcal damar oluşturmak üzere zincir amino grubunun bir lizin tortusu ile bir peptit bağlayıcıya bağlayan Sortaz (srtc) tarafından uyarılan kirpiklere sahiptir. *E. faecalis* izolatlarının neden olduğu deneysel endokarditin virülansında ve biyofilm oluşumunda önemli rol oynayan kirpikler olarak bilinen yapılardır (Budzik and Schneewind 2006). EBP üreten bu izolatların EBP operonunu kodladıkları ve SRTC genlerinin izolatlara göre daha üretken olduğu saptanmıştır. Kirpiksiz mutajenik izolatlar ve zar üretimi, otolizin sınırlayıcı (ATN) ve gen seti dahil olmak üzere diğer genetik belirleyicilerle ilişkilendirilebilir.

# 3. MATERYAL VE METOT

## 3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan materyaller yedi bölümden oluşmaktadır.

### 3.1.1 Cihaz ve malzemeler

Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipman ve malzemeleri Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

**Çizelge 3.1** Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipman ve malzemeleri

| **Makine** | **Şirket** |
|---|---|
| Otoklav | Ekspres (İngiltere) |
| Kuluçka makinesi | Memmert (Almanya) |
| Bileşik ışık mikroskop | Olympus (Japonya) |
| Elektrikli fırın | Memmert (Almanya) |
| Denge | Ohaus (Almanya) |
| Santrifüj | Hettich (Almanya) |
| Damıtıcı | Exelo (İngiltere) |
| Hassas terazi | Precisa (İsviçre) |
| pH ölçer | Jenway (Almanya) |
| ELISA | Organon NV (Belium) |
| Mikropipetler | Slamed (Almanya) |
| Mikro gözenekli filtre ünitesi | Gallenkamp (İngiltere) |
| Düz kılcal borular | Asistant (Almanya) |
| Pasteur pipetleri | |

### 3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

**Çizelge 3.2** Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler

| **Kimyasal malzeme** | **Üretici/Menşei** |
|---|---|
| NaOH | Merk (Almanya) |
| Formaldehit | BDH (İngiltere) |
| $H_2O_2$ | BDH (İngiltere) |
| Gliserol | BDH (İngiltere) |
| HCI | BDH (İngiltere) |
| NaCI | BDH (İngiltere) |
| $H_2SO_4$ | BDH (İngiltere) |
| $BaCl_2\,5H_2O$ | BDH (İngiltere) |
| Potasyum tellürit | BDH (İngiltere) |
| Ferrik amonyum sitrat | BDH (İngiltere) |

### 3.1.3 Kültür ortamı ve biyolojik materyaller

Çizelge 3.3'de çalışmada kullanılan kültür ortamları ve biyolojik materyaller gösterilmektedir.

**Çizelge 3.3** Çalışmada kullanılan kültür ortamı ve biyolojik materyaller

| **Kültür ortamı** | **Üretici/Menşei** |
|---|---|
| MacConkey´s agar | Oxiod (İngiltere) |
| Azid kanlı agar | Oxiod (İngiltere) |
| Muller-Hinton agar | Oxiod (İngiltere) |
| Beyin-kalp infüzyon agarı | Difico (ABD) |
| Besin suyu | Direk (İngiltere) |
| Kanlı agar tabanı | Oxiod (İngiltere) |
| Beyin-kalp infüzyon suyu | Difico (ABD) |
| Jelatin | Oxiod (İngiltere) |
| Triptikaz soya agarı | Difico (ABD) |
| Slideks Strepto kiti | Biyo-merieux (Fransa) |
| Agar-agar | Oxiod (İngiltere) |
| Maya özü | Hemedia (Hint) |
| Turnusol sütü | Difico (ABD) |
| Pepton | Oxiod (İngiltere) |
| Oxbile –tuz | BDH (İngiltere) |

### 3.1.4 Reaktifler ve boyalar

Çalışmada kullanılan reaktifler ve boyalar Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

**Çizelge 3.4** Çalışmada kullanılan reaktifler ve boyalar

| Boyalar | Üretici/Menşei |
|---|---|
| Fenol kırmızısı | BHD (İngiltere) |
| Gram boyama | Serum ve Aşı Enstitüsü (Bağdat) |
| Kristal menekşe boyası | BHD (İngiltere) |
| Hint mürekkebi | BHD (İngiltere) |

### 3.1.5 Şekerler

Çalışmada kullanılan şekerler Çizelge 3.5'de listelenmiştir.

**Çizelge 3.5** Çalışma sırasında kullanılan şekerler

| Şeker isimleri | Üretici/Menşei |
|---|---|
| Sakaroz | Merck (Almanya) |
| Glikoz | BDH (İngiltere) |
| Ksiloz | Merck (Almanya) |
| Sorbitol | Merck (Almanya) |
| Adonitol | BDH (İngiltere) |
| Arabinoz | Merck (Almanya) |
| Rafinolar | BDH (İngiltere) |
| Laktoz | Merck (Almanya) |
| Manitol | Merck (Almanya) |
| Sorboz | Merck (Almanya) |

### 3.1.6 Antimikrobiyal diskler

Çalışmada kullanılan antimikrobiyal diskler Çizelge 3.6'da listelenmiştir.

**Çizelge 3.6** Çalışma sırasında kullanılan antimikrobiyal diskler

| **Antibiyotiğin adı** | **Antibiyotik µg/disk konsantrasyonu** | **Sembol** | **Üretici/Menşei** |
|---|---|---|---|
| Vankomisin | 30 | VA | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Siprofloksasin | 5 | CIP | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Kloksasilin | 1 | CX | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Sefotaksim | 30 | CTX | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Rifampisin | 5 | RA | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Amoksasilin | 25 | AX | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Nalidiksik asit | 30 | NA | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Tetrasiklin | 30 | TE | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Eritromisin | 15 | E | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Kalemlin | 10 birim | P | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Trimetoprim | 25 | SXT | Biyoanaliz (Türkiye) |
| Amoksasilin +Klavulanik asit | 30 (20+10) | AC | Biyoanaliz (Türkiye) |

### 3.1.7 Standart suş

Standart suş, Pasteur Enstitüsünden temin edilen Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümünden temin edildi.

## 3.2 Yöntem

Çalışmamız kapsamında üç ayrı sterilazsyon yöntemi kullanılmıştır.

### 3.2.1 Fırında kuru sterilizasyon

Kullanılmış cam eşyaları 180ºC sıcaklıkta iki saat sterilize etmek için elektrikli fırın kullanılmıştır (Tariq and Hadithi 1993).

### 3.2.2 Otoklav ile sterilizasyon

Tüm kültür ortamları 121ºC sıcaklıkta ve 15 libre/inç² basınçta 15 dakikalık süre boyunca otoklav ile sterilize edilmiştir (Collins and Lyne 1970).

### 3.2.3 Filtreleme ile sterilizasyon

Çalışma sırasında kullanılan solüsyonlar 0,45 μm çaplı Millipore filtreden süzülerek sterilize edilmiştir (Tariq and Hadithi 1993).

## 3.3 Kültür ortamı

Kültür besiyeri, üretici firmanın ambalajların üzerinde yer alan talimatlarına göre hazırlanarak pH değeri (7,2)'ye ayarlandıktan sonra Otoklav cihazı ile 121ºC'de 15 dakika süre 15 libre/inç² basınçta steril edildi. Kültür ortamının 37°C'de kontamine olmaması için 24 saat inkübe edildi ve ardından kullanılıncaya kadar 4°C'de tutuldu.

### 3.3.1 Azid kanlı agar

Enterokokal bakterileri farklı hastalık modellerinden izole etmek için kullanılan seçici bir besiyeridir (Treagan and Pulliam 1982).

### 3.3.2 Kanlı agar

Ortam, enterokok bakterilerini izole etmek ve büyütmek ve bunların hemolizin üreterek hemoliz yapma yeteneklerini anlamak amacıyla kullanıldı (Huycke *et al.* 1991, Jett *et al.* 1992).

Yukarıda belirtilen iki ortam için ayrı ayrı steril besiyeri hazırlandı ve oda sıcaklığında 50-45°C arasında soğumaya bırakıldı ve her ortam için (%5) Bakuba'daki kan bankasından insan kanı eklendi. General Hospital, daha sonra besiyerleri Petri kaplarına dağıtılarak 10-15 dakika sertleşmesi için bekletildi ve ardından 4°C sıcaklıkta kullanıma kadar bekletildi.

### 3.3.3 MacConkey agar

Enterokok bakterilerini izole etmek için kullanılan seçici bir besiyeridir (Treagan and Pulliam 1982). Steril besiyeri hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 45-50°C arasında soğumaya bırakıldı, ardından petri kaplarına dağıtıldı ve 15-10 dakika katılaşmaya bırakıldı ve daha sonra kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu.

### 3.3.4 Beyin-kalp infüzyon suyu (BHIB)

Enterokok izolatlarının geliştirilmesi ve idamesi için kullanılmıştır (Iwen *et al.* 1999, Xu *et al.* 2000). Kan kültürü amacıyla da kullanılan besiyeri iyice çözülerek kan kültürü şişelerinin bir bölümüne 50 mL, diğer bölümüne 100 mL dağıtılmıştır (Vandepitte *et al.* 2003). Steril test tüplerinde 5 mL oranında besiyerini otoklav ile sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldıktan sonra kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu.

### 3.3.5 Beyin-kalp infüzyon agarı (BHIA)

Enterokok izolatlarının geliştirilmesi için kullanılmıştır (Manero and Blanch 1999).

### 3.3.6 Üçlü soya agar (TSA)

Enterokok izolatları için motilite testleri ve boya üretimi testleri yapmak amacıyla kullanılmıştır (Facklam and Collins 1989, Desai *et al.* 2001). Steril besiyerleri ayrı ayrı hazırlanarak oda sıcaklığında 45-50°C arasında soğumaya bırakılmış, daha sonra petri kaplarına dağıtılarak 15-10 dakika katılaşmaya bırakılmış ve daha sonra oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu.

### 3.3.7 Litmus süt ortamı

Besiyeri, enterokok izolatlarının teşhis edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Ortam iyice eritildikten sonra 5 mL oranında test tüplerine dağıtılır ve ortamın daha uzun süre yüksek

ısıya maruz kalması özelliklerini değiştirdiği için otoklavda 5 dakika sterilize edilir (Hanson and Cartwright 1999). Ortam oda sıcaklığında soğumaya bırakılır ve ardından kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu.

### 3.3.8 Muller-hinton agar

Ortam, enterokok izolatlarının ilaç duyarlılık testlerinde difüzyon yöntemi ile kullanılmıştır. Steril ortam hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında 45-50°C arasında değişen bir sıcaklıkta soğumaya bırakıldı, ardından petri kaplarına dağıtıldı ve katılaşması için 15-10 dakika bekletildi. Son olarak kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu.

## 3.4 Teşhis için Kullanılan Tarımsal Besiyeri

### 3.4.1 Tuz toleransı test ortamı

Bu besiyeri, enterokokal bakterilerin izolasyonu için yarı seçici besiyeridir. Ortam 6,5 g NaCl'nin 100 mL BHIB ortamı içinde eritilmesi ve pH'ın 7,2'ye ayarlanmasıyla hazırlandı ve tüp başına 5 mL oranında steril test tüplerine dağıtıldı. Daha sonra ortam otoklav ile sterilize edildi ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı, ardından kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu (Collee *et al.* 1989).

### 3.4.2 Alkalin tolerans test ortamı

Bu besiyeri, enterokok bakterilerini izole etmek için yarı seçici kabul edilir. BHIB ortamı üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı, ardından sodyum hidroksit çözeltisi (0,1N) ilave edilerek pH 9,6'ya ayarlandı ve steril test tüplerine dağıtıldı. Tüp başına 5 mililitre oranında besiyeri otoklav ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu (Facklam 1972).

### 3.4.3 Aeskülin hidroliz test ortamı

Enterokok bakterilerini izole etmek için kullanılan seçici bir besiyeridir. Safra-aesculin agar ortamı, belirtildiği gibi (Et ekstresi 3g, Peptone 5g, Ox safra 10g, Aesculine 1g, Ferrik amonyum sitrat 0,5g, NaCl 5g, Agar 15g, distile su 1 litre) materyallerden hazırlandı (Collee *et al.* 1989).

45-50°C arasında değişen sıcaklıkta, üzerine steril askolin şeker solüsyonu süzülerek ilave edildi ve besiyeri, tüp başına 5 mililitre oranında steril test tüplerine dağıtıldı ve 10-15 dakika bekletildi. Katılaştıktan sonra kullanılıncaya kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu. Besiyeri petri kutularına dağıtılarak 10-15 dakika katılaşmaya bırakıldı ve ardından kullanılana kadar 4°Csıcaklıkta tutuldu (Baron *et al.* 2003).

### 3.4.4 Potasyum tellürit tolerans test ortamı

Enterokok izolatlarını teşhis etmek için kullanılan seçici bir besiyeridir. Besiyeri, (Facklam 1972)'de belirtilene göre, üretici firmanın talimatlarına göre 1 litre BHIA ortamı hazırlanarak, ardından 1N HCl eklenerek, sterilize edilip pH 6,0'a ayarlanarak hazırlandı. Besiyeri otoklava konularak oda sıcaklığında bekletilerek 45-50°C arasında değişen oda sıcaklığına soğutulur, ardından her birine 50 mililitre (Baquba General Hospital'daki kan bankasından sağlanan) insan kanı ve bir 150 mililitre damıtılmış suda steril 0,5 g süzülmüş potasyum tellürit çözeltisi eklenir daha sonra ortam petri kaplarına dağıtılır ve katılaşması için 10-15 dakika bekletilir. Ardından kullanılana kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu.

### 3.4.5 Şeker fermantasyon test ortamı

Bu ortamlar, enterokok tiplerini teşhis etmek ve sınıflandırmak için kullanıldı. Ortam, 10 g pepton, 5 g sodyum klorür, 50 mL fenol kırmızısı reaktif (%0,2) çözülerek hazırlandı. 1 litre distile su içerisinde pH 8,4'e ayarlandıktan sonra behere 100 mL oranında dağıtıldı ve otoklavda sterilize edildi. Ardından 45-50°C'de soğuması için oda sıcaklığında

bırakıldı. Her bir şişeye, hazırlanan şekerlerden birinin çözeltilerinin %10 konsantrasyonunda 10 mililitre steril filtre edilmiş şeker çözeltisi eklendi. Böylece ortamdaki her bir şekerin nihai konsantrasyonu %1 olacak şekilde ortam steril laboratuvar tüplerine tüp başına 5 mililitre oranında dağıtıldı ve daha sonra kullanılana kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu (Collee *et al.* 1989).

### 3.4.6 Gliserol fermantasyon test ortamı

Besiyeri, enterokok türlerinin teşhis edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Şekerlerin fermantasyonu için testte kullanılan ortamın 100 mililitresine %10 konsantrasyonda (bir mililitre saf gliserolün 10 mililitre damıtılmış suda seyreltilmesi ve ardından filtre edilerek sterilize edilmesiyle) bir gliserol çözeltisi ilave edilerek hazırlanır, gliserolün nihai konsantrasyonu %1 olacak şekilde besiyeri laboratuvar tüplerine dağıtıldı. Tüp başına 5 mililitre oranında sterilize edildi ve sonra kullanılana kadar 4°C sıcaklıkta tutuldu (Collins and Lyne 1970).

### 3.4.7 Jelatin sıvılaştırma test ortamı

Cruickshank *et al.* (1973)'te belirtildiği gibi, 12 g jelatini 100 mL besin suyu ortamında eriterek, pH'ı 7,2'ye ayarlayarak ve ardından ortam steril test tüplerinde dağıtarak hazırlandı. Her tüp için 5 mL oranında besiyeri otoklav ile sterilize edilir, oda sıcaklığında soğumaya bırakılır ve hemen kullanılır.

### 3.4.8 Üç eksenli orta test

Besiyeri, enterokokal bakterileri teşhis etmek amacıyla kullanıldı. Escoline ayrışması, tuzluluk toleransı ve hareketlilik testi için bir test içerir. Ortam, Hanna *et al.* (2002)'de bahsedildiği gibi (BHIB 3,7 g, Asculine 0,2 g, NaCl 6,5 g, Agar 1,5 g, Ox-safra 1 g, Ferrik amonyum sitrat 0,5 g) malzemeler kullanılarak hazırlandı. Maddeler 100 ml'de çözülür, damıtılır, daha sonra 5 mililitre oranında test tüplerine dağıtılır ve otoklav ile sterilize

edilir, ardından katılaşması için 10-15 dakika bekletilir ve kullanılıncaya kadar 4°C'de tutulur.

### 3.4.9 Arabinoz ve ksiloz fermantasyon test ortamı

Besiyeri, enterokok tiplerinin teşhis edilmesi ve sınıflandırılması amacıyla kullanılmıştır. Ortam, her biri ayrı ayrı şeker arabinoz ve ksilozun nihai konsantrasyonu (%1) ile BHIB kullanılarak hazırlandı ve her ortam için 1 mililitre fenol kırmızısı reaktif ilave edildi, ardından pH 7,4'e ayarlandı. Besiyeri steril laboratuvar tüplerine tüp başına 5 mililitre oranında dağıtıldı ve otoklavda 3-5 dakika sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve ardından 4°C sıcaklıkta tutuldu (Hanson and Cartwright 1999).

### 3.4.10 Hareket testi ortamı ve pigment üretimi

TSA besiyeri, enterokok izolatlarının pigment üretme yeteneklerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Aynı besiyeri, hareket testi için de kullanıldı. (Iwen *et al.* 1999, Hanson and Cartwright 1999).

## 3.5 Boyaların, Reaktiflerin ve Çözeltilerin Hazırlanması

Bu bölüm dört başlık altında incelenmiştir.

### 3.5.1 Boyalar

#### A. Gram boyama

Gram boya çözeltileri, Bağdat Serum ve Aşılar Enstitüsünden temin edilerek hazırlandı ve Kristal menekşe boyası, Gram iyot boya stabilizatörü ve (%95 konsantrasyonda %30 aseton+%70 etanol), zıt boya Sufranin kullanıldı. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin mikroskobik farklılaşması için gram-boya solüsyonları kullanıldı (Cruickshank *et al.* 1973).

**B. Çini mürekkebi**

BDH (İngiltere) tarafından üretilen boya, enterokok izolatlarının kapsüler kapasitesini belirlemek için kullanıldı (Cruickshank *et al.* 1973).

### 3.5.2 Reaktifler

**A. Katalaz reaktifi**

BDH (İngiltere) tarafından (%3) konsantrasyonda üretilen reaktif, enterokok izolatlarının katalaz enzimi üretme yeteneğini test etmek için kullanıldı (Baron *et al.* 2003).

**B. Henol kırmızı gösterge**

Collee *et al.* (1989)'da bahsedilene göre, (0,2) ve (0,006) g fenol kırmızısının her biri ayrı ayrı hazırlanan 2 mililitre sodyum hidroksitte çözülmesiyle hazırlandı. Buna 4 mililitre damıtılmış su ısıtılarak ilave edildi, ardından buna 2 mililitre HCL ilave edilerek hazırlanan 2 mililitre HCL ilave edildi. 10 mililitre damıtılmış su, hacmi (%0,2) ve (%0,006) nihai konsantrasyon elde etmek için 100 mililitre damıtılmış suya tamamlandı ve ardından kullanıma kadar steril bir cam şişede saklandı.

### 3.5.3 Çözeltiler

**A. Standart bulanıklık çözeltisi**

Baron *et al.* (2003)'de belirtilenlere göre hazırlanmıştır;

- Baryum klorür $BaCl_2$ çözeltisi, 1,75 gm sulu baryum klorürü 90 mL damıtılmış suda çözerek hazırlanır ve ardından hacmi 100 mL olana kadar damıtılmış su ile tamamlandı.

- (%1) konsantrasyonda konsantre sülfürik asit çözeltisi $H_2SO_4$, 1 mL konsantre sülfürik asidi (%100) 90 mL damıtılmış suda eriterek hazırlanır, ardından hacmi 100 mL olana kadar damıtılmış su ile tamamlandı.

99,5 mL çözelti b'ye ve 0,5 mL çözelti a ilave edildi, sonra iyice karıştırıldı ve çözelti, buharlaşmayı önlemek için sıkıca kapatılmış cam tüplere dağıtıldı ve oda sıcaklığında karanlıkta tutuldu. Tüplerin içeriği kullanımdan önce karıştırıldı. Yaklaşık olarak 1,5×108 CFU'ya eşit hücre sayısı elde etmek için üreme hücrelerinin sayısını kalibre etmek için solüsyonu kullanıldı.

**B. Beta-laktaz enzimini belirlemek için kullanılacak çözeltiler**

Koneman *et al.* (1992)'de belirtilenlere göre ve aşağıdaki şekilde hazırlandı;

- %0,5 Fenol kırmızısı reaktifi (Ralovich 1984) 'te bahsedilene göre 2,5 g fenol kırmızısının 40 mililitre sodyum hidroksit çözeltisi içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Ardından, nihai bir konsantrasyon (%0,5) elde etmek için hacmi 500 mililitre olacak şekilde damıtılmış suyla tamamlanmıştır.
- Anti-penisilin
- Penisilin G; Bir milyon birim antibiyotiği 16,6 mililitre damıtılmış suda eriterek hazırlanır.

**C. Sulu menekşe kristal çözeltisi (%1)**

Baker and Silverton (2014)'a göre; 1 gram sulu menekşe kristali 100 mililitre damıtılmış suda eritilerek kullanılmak üzere hazırlandı. %1'lik solüsyon filtreleme yöntemiyle sterilize edildi ve kullanıma kadar oda sıcaklığında steril opak cam şişede saklandı.

**D. Seyreltme solüsyonu**

8,5 g sodyum klorürü bir litre damıtılmış suda eriterek ve pH'ı 7,5 ayarlayarak fizyolojik tuz solüsyonu hazırlanır, ardından otoklav ile sterilize edilir ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılır (Baron *et al.* 2003).

**E. Sodyum hidroksit çözeltisi (N1) ve (N0.1)**

Sodyum hidroksitin moleküler ağırlığı 40 g'dır. (N1) sodyum hidroksitten 40 g sodyum hidroksitin, 300 mililitre damıtık suda eritilmesiyle hazırlanır, ardından hacmi bir litre damıtık suya tamamlanır. (N0.1) sodyum hidroksit ise 4 g, 300 mililitre distile su içinde çözülerek hacmi bir litre distile suya tamamlanarak filtrasyon yöntemiyle sterilize edilerek hazırlanır (Baker and Silverton 2014).

**H. Formaldehitli çözeltisi (%10)**

Baker and Silverton (2014)'de belirtilene göre 100 mililitre (%40) konsantrasyonda formaldehit çözeltisi ve 8,5 g sodyum klorür 400 mililitre damıtılmış suda çözerek hazırlanır ve hacmi bir litre suya tamamlanır. Son konsantrasyonu (%10) elde etmek için damıtılarak kullanıma kadar oda sıcaklığında steril bir cam şişede tutuldu.

**F. Şeker çözeltisi (%10)**

Sorbitol, mannitol, rafinoz, arabinoz, laktoz, glikoz, ksiloz, sorboz, sukroz, adonitol olmak üzere her birinin ayrı ayrı 10 mL damıtılmış suda eritilmesiyle her bir şekerin (%10) nihai konsantrasyonunu elde etmek üzere hazırlanır (Collins and Lyne 1970, Collee *et al.* 1989).

### 3.5.4 Bakteri izolatlarının korunması ve bakımı

Günlük çalışma kültürleri, temel kan agar besiyerinde muhafaza edildi, burada besiyeri, izole edilecek izolatın tek bir saf kolonisi ile inoküle edildi, ardından 37°C'lik bir sıcaklıkta inkübe edildi. 24 saatin, ardından tabaklar petriler parafin mumu ile kaplandı.

Bakteriyel izolatların devamlılığı için bir BHIA slant ortamı kullanıldı. İzolatlar, üremeleri için ideal koşullarda bazik kanlı agar besiyerinde büyütüldükten sonra, tek bir saf koloni bıçaklama yöntemiyle slanted besiyerine aktarıldı, ardından 37℃ sıcaklıkta 24 saat inkübe edildi, ardından petriler parafin mumu ile kaplandı ve aylık yenilemelerle 4℃ sıcaklığında tutuldu (Vandepitte *et al.* 2003).

## 3.6 Numune Toplama

Global klinikler, Ajyal pediatri diş kliniği ve AL-Yarmouk Eğitim hastanelerini ziyaret eden diş çürüğü olan okul öncesi çağındaki çocuklar (3-5 yaş) ve okul çağındaki çocuklardan (6-12 yaş) (erkek+kız) toplam 100 numune toplandı. Alınan örneklerin araştırmaya alınmasında; örneklemeden önceki 4 hafta boyunca antibiyotik tedavisi uygulanmamasını, ağız çalkalama suyu kullanılmamasını veya antimikrobiyal maddelere maruz kalma ve sistemik hastalığa maruz kalmayı içerebilecek başka herhangi bir önleyici tedbire sahip olmamaları bakımından dikkat edildi.

## 3.7 Bakteri İzolatlarının Teşhisi

Bu bölüm dört alt başlık halinde incelenmiştir.

### 3.7.1 Kültürel ve morfolojik özellikler

Her besiyeri için inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, kaplar inkübatörden çıkarıldı ve temel kanlı agar besiyerinde ve aşağıdaki seçmeli kültür besiyerlerinde (kan azid agar, Maconkey agar) belirgin morfolojik ve kültivar özellikleri gözlendi. Standart izolatların

ayırt edici özellikleri bu besiyerlerinde gözlemlenmiş ve aynı türün izolatları ile karşılaştırılmıştır.

### 3.7.2 Mikroskobik inceleme

Bakteri kolonilerinin yayma dilimleri, temiz bir cam lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılarak ve kolonilerin (2-3) steril bir taşıyıcı ile aktarılıp lam üzerine yayarak kullanılan kültür ortamı üzerinde çalışıldı. Havada kurutuldu ve ardından birkaç kez alevle sabitlendi ve ardından gram boya ile boyandı ve açılı bırakılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Smearler yağ merceği altında ışık mikroskobu ile incelendi ve bakteri koloni hücrelerinin şekli, dizilişi ve pigmentasyonu ayırt edildi.

### 3.7.3 Biyokimyasal testler

**A. Katalaz Testi**

Bu test, bakteri izolatlarının, hidrojen peroksit molekülünü, su ve oksijene ayırmaya çalışan katalaz enzimini üretme yeteneğini saptamak için kullanıldı. Uygulamadan birkaç saniye sonra oksijen kabarcıklarının ortaya çıkması testin pozitif olduğunun göztergesi olarak kabul edildi (Cruickshank *et al.* 1973, Baron *et al.* 2003).

**B. Tuz tolerans testi**

Bu test, bakteri izolatlarının (6,5) NaCl konsantrasyonuna sahip BHIB ortamında büyüme yeteneğini belirlemek için kullanıldı. Tuzluluk tolerans test ortamı, ortamdaki çalışılan bakteri izolatlarının her birinden 2-3 koloni ile inoküle edildi ve 37°C'de 3 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra bulanıklığın ortaya çıkmasıyla ve standart izolatla ve aşılamasız besiyeri içeren kontrol tüpüyle karşılaştırıldıktan sonra sonuç pozitif olarak değerlendirildi (Collee *et al.* 1989).

**C. Alkalin tolerans testi**

Bu test, bakteri izolatlarının pH'ı 9,6 olan BHIB ortamında büyüme yeteneğini belirlemek için kullanıldı. Bazal tolerans test ortamı, besiyerinde çalışılan bakteri izolatlarının her birinden 2-3 koloni ile inoküle edildi ve 37°C'de 3 gün süreyle inkübe edildi. Sonuç, inkübasyon süresinden sonra ve kontrol tüpü ve standart izolasyonla karşılaştırıldıktan sonra bulanıklığın ortaya çıkmasıyla pozitif olarak kabul edildi (Facklam 1972).

**D. 10°C ve 45°C'de büyüme**

Bu test, bakteri izolatlarının 10°C ve 45°Csıcaklıklarda üreme yeteneğini belirlemek için kullanıldı. 2-3 bakteri izolatının her birinin kolonileri, belirtilen sıcaklıklarda iki tüp büyüme test ortamına aşılandı. İlk tüp 10°C sıcaklıkta ve ikinci 45°C sıcaklıkta 7 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra ve kontrol tüpü ve standart izolasyonla karşılaştırıldıktan sonra bulanıklığın ortaya çıkmasıyla sonuç pozitif olarak kabul edildi (Collee *et al.* 1989).

**E. Aeskülin hidroliz testi**

Bu test, bakteriyel izolatların Aesculin'i Ascultin'e indirgeme yeteneğini ve safra tuzlarının varlığında büyüme yeteneklerini belirlemek için kullanıldı. Bakteri izolatları laktasyon yöntemiyle inoküle edildi ve 37°C sıcaklıkta 48 saat inkübe edildi. Ortamın renginin sarıdan siyaha dönmesi testin pozitif olduğunun göstergesi olarak kabul edildi (Collee *et al.* 1989).

**F. Potasyum tellür tolerans testi**

Bu test, bakteriyel izolatların (0,04) konsantrasyonunda potasyum tellürit tuzlarının varlığında büyüme yeteneğini belirlemek için kullanıldı. Potasyum tellürit tuzları tolerans testi besiyeri, planlama yöntemiyle bakteri izolatlarının her birinden (2-3) koloni ile

inoküle edildi ve 37℃'de 3 gün inkübe edildi. İnkübasyon döneminden sonra siyah kolonilerin ortaya çıkması, pozitif testin bir işareti olarak kabul edildi (Facklam 1972).

**G. Şekerler ve gliserol fermantasyon testi**

Bu test, bakteri izolatlarının şekerleri ve gliserolü fermente etme ve ortamın pH'sını 8,9'dan 6,8'e düşürmeye neden olan asit üretme yeteneğini belirlemek için kullanıldı ve böylece kırmızı fenol reaktifinin rengi sarıya döndü. Şeker ve gliserol fermantasyonu için test ortamı, bakteri izolatlarının her birinden 2-3 koloni ile aşılandı ve 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Sonuçlar inkübasyon döneminden sonra gözlemlendi. Ortamın kırmızıdan sarıya dönüşmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi. Olumsuz sonuç, ortamın kırmızı kalmasıdır (Collins and Lyne 1970, Collee *et al.* 1989).

### 3.7.4 Enterokok bakterileri için hizli teşhis yöntemleri

Ortalama Üçlü Eksen Testi: Bu besiyeri, enterokokal bakterilerin hızlı başlangıç teşhisi amacıyla kullanıldı ve bir besiyerinde üç biyokimyasal test, yani bakteriyel izolatların eskülin bozulmasına duyarlılık testi, tuz tolerans testi ve motilite testi içerir. Üçlü test ortamı, bakteri izolatlarının her birinden 3-5 saf koloni bıçaklama yöntemiyle inoküle edildi ve tüpler 37°C'de iki saat süreyle inkübe edildi. İmplant hattında siyah oluşumların görülmesi, pozitif sonucun bir işareti olarak kabul edildi (Hanna *et al.* 2002).

Hızlı Teşhis Testleri: Hanson and Cartwright (1999)'da belirtilen yöntem enterokokal bakteri türlerinin hızlı teşhisi için kullanıldı.

- **Turnusol sütü azaltma testi**

Bu test, bakteri izolatlarının kamelya sütünü azaltma yeteneğini belirlemek için yapılmıştır, çünkü süt azaltma testinin besiyeri, bakteri izolatlarının her birinden 3-5 saf koloni ile aşılanmıştır ve tüpler, 4 saatlik bir süre boyunca 37℃ sıcaklıkta tutulmuştur. Ortamın renginin mordan beyaza değişmesi testin pozitif olduğunu gösterir.

- **Arabinoz ve ksiloz fermantasyon testleri**

Bu test, bakteri izolatlarının arabinoz ve ksiloz şekerlerini fermente etme yeteneğini belirlemek için yapılmıştır. Arabinoz ve ksiloz fermantasyon ortamı, bakteri izolatlarının her birinden ayrı ayrı her bir şekerin 3-5 saf kolonisi ile aşılandı. Tüpler 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Kuluçka süresinden sonra renk kırmızıdan sarıya döndükten sonra sonuç pozitif kabul edildi.

- **Sarı pigment üretim testi**

Bu test, bakteri izolatlarının TSA ortamında sarı pigmentler üretme yeteneğini belirlemek için yapılmıştır. Sarı boya üretim test ortamı, bakteri izolatlarının her birinden 3-5 saf koloni inoküle edilip 37°C'de 4 saat inkübe edilmesi ile gerçekleşir. Kolonilerin sarı renklenmesi, sarı pigmentin üretimini ve testin pozitif olduğunun göstergesidir.

- **Hareketlilik testi**

Bu test, bakteri izolatlarının TSA ortamındaki hareketliliğini belirlemek için yapılmıştır. Motilite test ortamı, çalışılan bakteri kolonilerinin (3-5) bıçaklama yöntemiyle aşılanması ile gerçekleşir. Ardından tüpler 37°C sıcaklıkta 4 saat süreyle inkübe edildi. İzolatlar, büyümenin tozlaşma çizgisinin ötesindeki mesafelere yayıldığını fark ettikten sonra hareketli olarak sayıldı.

## 3.8 Virulans Faktörlerinin Saptanması

Bu bölüm beş başlık altında incelenmiştir.

### 3.8.1 Hemolizin üretiminin saptanması

Bu test, bakteri izolatlarının hazırlanan besiyerinde hemolitik hemolizin üretme yeteneğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışılan bakteri izolatları hazırlanan besi

yeri plaklarına inoküle edildi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Kolonilerin çevresinde β-hemolizi gözlemleyerek sonuçları okundu (Huycke *et al.* 1991, Desai *et al.* 2001).

### 3.8.2 Jelatinaz üretiminin saptanması

Bu inceleme, bakteri izolatlarının jelatinaz enzimini üretme yeteneklerini belirlemek için yapılmıştır. 30 dakikalık bir süre içinde, jelatinin çözünmesi ve bir sıvıya dönüşmesi ile katı jelatin içeren aşılanmamış kontrol tüpüyle karşılaştırılmasıyla elde edilen sonuçlar pozitif olarak değerlendirilir (Cruickshank *et al.* 1973).

### 3.8.3 Kapsülün tespiti

Bakteri izolatlarının kapsül duyarlılığını saptamak için Hint mürekkebi yöntemi kullanıldı. Çalışılan bakteri izolatlarının her birinden kültür halkası yardımıyla birer bez alınarak temiz bir cam lam üzerine yerleştirildi ve üzerine bir damla hint mürekkebi eklenip karıştırıldıktan sonra karışım lam yüzeyine yayıldı ve lam kuruması için oda sıcaklığına bırakıldı ve inceledi. Siyah arka planla aydınlatılan alanların gözlemlenmesi, kapsülün varlığının bir göstergesi olarak kabul edildi (Hanna *et al.* 2002).

#### 3.8.3.1 Epitel hücrelerine adezyonun tespiti

İnsan epitel hücre süspansiyonunun hazırlanması, İdrar yolu enfeksiyonu olmayan kadınlardan ortalama bir idrar örneği (MSU) alındı, ardından örnek bir santrifüj cihazı kullanılarak 5 dakika 1000 döngü/dk hızında santrifüjlendi. Epitel hücrelerini içeren çökelti, her seferinde santrifüjleme ile dört kez fizyolojik tuzla yıkandı, ardından çökelen epitel hücreleri, aynı transformatörle süspanse edildi (Hagberg *et al.* 1981).

Bu test, bakteri izolatlarının epitel hücrelerine yapışma yeteneğini belirlemek için yapılmıştır. Hazırlanan 0,5 mL bakteri süspansiyonuna ve 0,5 mL epitel hücre süspansiyonu eklenir ve karışım iyice karıştırılır ve her 10 dakikada bir karıştırarak 37°C'de bir saat süreyle inkübe edilir. Hücreler, yapışmayan bakterilerden kurtulmak için

her seferinde santrifüjleme ile fizyolojik tuz solüsyonu ile dört kez yıkanır. Nihai süspansiyondan bir damla alınarak bir cam slayt üzerine yerleştirildi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve ardından alev üzerinden geçirilerek sabitlendi. Lam, gram boyası ile boyandı ve mikroskobik olarak incelendi. Üreme hücrelerinin epitel hücrelerine yapışması gözlenerek sonuç pozitif kabul edildi. Kontrol testi olarak epitel hücreleriyle birlikte fizyolojik tuz solüsyonu kullanıldı (Iwahi *et al.* 1983).

### 3.8.4 Beta-laktaz enziminin saptanması: β-laktamaz üretimi

Koneman *et al.* (1992)'de belirtilenlere göre hazırlanmıştır. Buna göre;

- Hazırlanan %0,5 fenol kırmızısı reaktif çözeltisinden iki mililitre penisilin C çözeltisine ilave edildi.
- Hazırlanan NaCl (N1) solüsyonundan damlalar halinde solüsyonun rengi menekşe rengine dönene ve pH 8,5 olana kadar ilave edildi.
- Hazırlanan solüsyona kılcal borunun ucu (1-2 cm) batırılır. Daha sonra 24 saat bekletilen bakteri kolonisine daldırılarak kapiller tüp içerisindeki solüsyon ile koloni temas edene kadar bakteri tıkacı yapmak amacıyla kapiller açıklığı kapatılarak solüsyon arasında baloncuk oluşması engellenir.
- Kapiler tüpler dikey olarak 37°C'de inkübe edilir ve sonuç 5-15 dakika içinde okunur. Koloninin tepesindeki rengin sarıya dönüşmesi testin pozitif bir sonucu olarak değerlendirilir.

### 3.8.5 Biyofilm oluşumunun tespiti

Sandoe *et al.* (2003)'de belirtilenlere göre hazırlanmıştır. Buna göre;

- 1-2 günlük bakteri izolatlarının 3-4 şeridi ile 10 mL BHIB ortamının tüpleri çalkalamadan inoküle edilir ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi.
- Gelişen üreme hücreleri her seferinde santrifüj edilerek fizyolojik tuz solüsyonu ile iki kez yıkandı.

- Plakanın çukurlarından her izolata ikişer delik tahsis edilen (96) delikten oluşan Polyester malzemeden üretilmiş düz bir mikroplaka kullanıldı. BHIB ortamının bakteriyel izolatlarını 180 mikrolitresi test etmek için belirlenen tüm deliklere her izolattan 20 mikrolitre inoküle edildi. İlk üç çukur, 200 mikrolitre BHIB ortamının aşılama yapılmadan yerleştirildiği bir kontrol testi olarak bırakıldı. Plaka, 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi.
- Çukurların içerikleri, 200 mikrolitrede sabitlenmiş bir mikropipet kullanılarak kaldırıldı, ardından çukurlar, bir ELISA-yıkayıcı kullanılarak fizyolojik tuz çözeltisi kullanılarak bir kez yıkandı.
- Bakteri izolatlarının oluşturduğu biyofilm, hazırlanan formaldehit solüsyonunun (%10) her bir deliğine 200 mikrolitre yerleştirilerek plak çukurlarının iç yüzeylerine sabitlendi. 5 dakika sonra bir pipetle kaldırıldı. Çukurların içerikleri, 200 mikrolitrede sabitlenmiş bir mikropipet kullanılarak kaldırıldı ve plaka 24 saat oda sıcaklığında bırakıldı.
- Hazırlanan (%1) mor solüsyon boya çözeltisi kuyucukların her bir deliğine 200 mikrolitre uygulanarak oluşan biyofilmin boyanması sağlandı.
- ELISA okuyucu kullanılarak 590 nm dalga boyunda optik yoğunluk okumalar alındı.
- Doğru nihai sonucu vermek için boş çukurların ve üç kontrol çukurunun optik yoğunluğunun sapma oranının ayrı ayrı her bir okumanın ortalamasından çıkarılarak hesaplamalar yapıldı. Kalan sayı sıfırdan (0) büyükse sonuç pozitif olarak değerlendirildi. Deney farklı günlerde iki tekerrür halinde yapıldı.

### 3.9 Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Casals (1979)'da belirtilenlere göre yapılmıştır. Buna göre;

- 5 mL BHIB ortamı, 3-4 bakteri izolatlarının süpernovalarıyla 24 saatte steril Loop vektörü kullanarak inoküle edildi.
- Dikimden sonra tüpler iyice çalkalandı ve 37℃ sıcaklıkta 2-5 saat ortada bir bulanıklık oluşana kadar inkübe edildi. Büyümenin bulanıklığı, hazırlanan standart bulanıklık sabitinin (McFarland çözeltisi) bulanıklığı ile karşılaştırıldı.

- Steril bir pamuklu çubuk bakteri süspansiyonuna daldırıldı ve tüpün kenarlarına bastırılarak fazlalık uzaklaştırıldı. Hazırlanan Mueller-Hinton-Acker besiyeri üzerinden plak 60 derecelik açıyla döndürülürken üç yönde planlama yöntemiyle sürüntü geçirildi. Kaplar, kültürler emilip kuruyana kadar 5 dakika oda sıcaklığında bırakıldı.
- Antibakteriyel diskler steril forseps ile bakteri süspansiyonu inoküle edilen agarın yüzeyine plak başına 6 tablet olacak şekilde aktarıldı ve yumuşak bir şekilde bastırılarak tabak kenarı ile tabletler arasında karışmaması için bir boşluk bırakıldı.
- Kaplar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bölgelerin çapları bir cetvel kullanılarak ölçüldü ve standart geciktirici bölge çaplarının standart oranlarıyla karşılaştırıldı.

### 3.10 İstatistiksel Analiz

Çalışma sırasında toplanan sonuçlar bir bilgisayar veri tabanına aktarıldı ve on SPSS 13 programı kullanılarak analiz edildi. Önce seçilen değişkenlerden bazılarının dağılımı tamamlandı. İki değişken kategorisinin her biri arasındaki aralık ile istatistiksel ilişkiler, ki kare testi kullanılarak değerlendirildi. İkili değişkenlerin her iki kategorisi arasındaki istatistiksel ilişkiler, küçük örneklem boyutu nedeniyle Fisher Exact testi ile değerlendirildi. 0,05'ten küçük olan P değerleri, istatistiksel testler aracılığıyla bulunan her yerde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

# 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

## 4.1 Enterokok İzolatlarının Sınıflandırılması

Çalışma süresi boyunca teşhis edilen 44 enterokok tür ve sayıları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre, *E. faecalis* 30 izolat (%68,2) ile ilk sırada yer alırken, onu 10 izolatla *E. faecium* (%22,7), 3 izolat ile *E. gallinarium* (%6,8) ve 1 izolat ile *E. avium* (%2,3) izlemektedir.

**Çizelge 4.1** Teşhis edilen Enterokok türlerinin sayıları ve yüzdeleri

| **Enterokok türleri** | **Yüzde (%)** | **Sayı** |
|---|---|---|
| *E. avium* | 2,3 | 1 |
| *E. gallinarium* | 6,8 | 3 |
| *E. faecium* | 22,7 | 10 |
| *E. faecalis* | 68,2 | 30 |
| Toplam | 100 | 44 |

Mevcut çalışmanın sonuçları, dünyanın farklı bölgelerinde yapılan birçok araştırmaya yakın olup, *E. faecalis*'in diğer enterokok bakteri türlerine kıyasla (%80-90) patolojik izolatlarda en sık görülen tür olduğunu doğrulamıştır. Bunu bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların %5-10'unu oluşturan *E. faecium*'u takip eder. Bu cinse ait diğer türler ise patolojik örneklerde daha az bulunurlar (Jett *et al.* 1994, Huycke *et al.* 1998, Zhanel *et al.* 2000).

Çalışmalar ayrıca enterokok bakteri türleri arasında *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların (%90) ve bu cinsin diğer türlerinin (%10) tıbbi açıdan önemli olduğunu göstermiştir (Iwen *et al.* 1999, Dutka-Malen *et al.* 1995). Bu, bahsedilen iki türün (%90,9) ve geri kalan türlerin çeşitli patolojik enfeksiyonları (%9,1) oluşturduğunu gösteren çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Mevcut çalışmanın sonuçları, toplam 202 tür içinde 172 (%86,5) oranıyla *E. faecalis* ve *E. faecium* olmak üzere iki türün baskınlığını gösteren Desai *et al.* (2001) çalışmasına benzerlik göstermektedir. Bu bakterilerin patojenik izolatları, geri kalan 30 (%14) izolat ise bu cinse ait dört tür için kaydedilmiştir. Yapılan çalışmaların çoğu, *E. faecalis*'in bu cinsin diğer

türleri üzerindeki baskınlığının nedenini, sindirim kanalında en yaygın türlerden biri olmasıyla açıklanabilir (Facklam *et al.* 1997). *E. faecium* izolatlarının insidansındaki artış, bu tipin hastane hastaları arasında yaygın olarak yayılmasından ve birçok antimikrobiyale karşı direnç kazanmaya yatkınlığından kaynaklanmaktadır (Moellering 1998, Leavis *et al.* 2004, Coque *et al.* 2005).

Çalışmamızda tespit edilen enterokok türlerinin oranları, *E. faecalis, E. faecium* ve *E. gallinarium* izolatlarının oluşturduğunu bulan Iraklı araştırmacı Hanna *et al.* (2002) çalışması da dahil olmak üzere birçok yerel ve uluslararası çalışma ile uyumluluk göstermiştir. Sırasıyla bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların yüzdesi %70,3, %22,2 ve %7,4 olarak belirlenmiştir. Kuveyt'te yapılan çalışmada enfeksiyon yüzdeleri %85,3 *E. faecalis* ve %7,7 *E. faecium* olarak tespit edilmiştir. Kore'de yapılan ve 605 patojen enterokok bakteri izolatının değerlendirilmesi ile yapılan çalışmada 330 izolatla *E. faecalis* (%55) en yaygın tür olarak bulunmuştur ve bunu, bunu *E. faecium* izolatları izlemiştir (Oh *et al.* 2005).

Bu çalışma, enterokok bakterilerinin neden olduğu patolojik enfeksiyonlara neden olan en fazla izolatın, farklı hastalık modellerinden 200 izolatın 152'sini (% 76) oluşturan *E. faecalis* olduğunu bulan Toledo-Arana *et al.* (2001) çalışmasıyla da aynı fikirdeydi. Bunu sırasıyla yüzde 35 (% 20) ve 7 (% 3,2) ile *E. faecium* ve *E. avium* izolatları izledi ve bu bakterilerin neden olduğu her enfeksiyon türü için *E. gallinarium* ve *E. duran* izolatları 1'i (% 0,5) oluşturdu. Ayrıca, mevcut sonuçlar, enterokok türleriyle enfeksiyonun 70 (%64,2) *E. faecalis* izolatına, 38 (% 35) *E. faecium* izolatına ve 1'e (% 1) belirtilmemiş bir izolatın dağıldığını gösteren Sandoe *et al.* (2003) çalışmasıyla da uyumluluk göstermektedir. Toplam (109) farklı patojen izolatın yanı sıra Dutka-Malen *et al.* (1995)'in yaptığı çalışmada 23 patolojik enterokokal izolat teşhis edilmiş ve bunlar; *E. faecalis* 13 (%57), *E. faecium* 7 (%30) ve *E. gallinarium* 3 (%13) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, İtalya'da yapılan çalışmadan farklı olarak *E. faecium* izolatlarının patolojik izolatlar içinde en yaygın olduğunu, 32 (%68) izolat oluşturduğunu ve bunu % 5 ile *E. faecalis* izolatlarının izlediğini göstermiştir.

## 4.2 İzole Edilen Enterokok Türlerinin Hastaların Cinsiyetine göre Dağılımı

Çizelge 4.2'deki sonuçlar, *E. faecalis* izolatlarının yüzdesinin, erkeklerde kadınlara kıyasla anlamlı olmayan bir farkla (P=0,52) daha yüksek olduğunu (% 75'e karşılık % 62,5) ve diğer enterokok türlerinde ise kadınlarda (% 37,5) erkeklerde (% 25) olduğunu göstermektedir.

**Çizelge 4.2** Hastaların cinsiyetine göre izole edilen enterokok türleri

| **Cinsiyet** | **Enterokok izolatları** | | | | | | **P. değeri** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis*** | | **Diğer türler** | | **Toplam** | | |
| | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** | |
| Kadın | 15 | 62,5 | 9 | 37,5 | 24 | 100 | 0,52 |
| Erkek | 15 | 75 | 5 | 25 | 20 | 100 | |

Bu bağlamda mevcut çalışmanın sonuçları, enterokokal bakterilerin her iki cinsiyetten insanları da enfekte ettiğini gösteren Murray (1990)'nin çalışmasıyla uyumluluk gçstermektedir. Huycke *et al.* (1991), bu mikroplarla enfeksiyondan kaynaklanan bakteriyemi ile enfekte kişinin cinsiyeti arasında anlamlı bir fark olmadığını gösteren çalışmanın yanı sıra Toye *et al.* (1998) çalışması ile Van C tipi mikropların cinsiyet ve izolat yüzdeleri arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızın sonuçları, erkek hastaların dışkılarından izole edilen VRE'nin kadınlardan daha yüksek olduğunu (%92,3'e karşı %55,5) belirten ve P=0,019'luk anlamlı bir fark bulan Kalocheretis *et al.* (2004) çalışmasıyla uyumlu değildir. Bu durum çalışmadaki vankomisin antikoruna duyarlı izolatların varlığından kaynaklanmış olabilir.

## 4.3 İzole Edilen Enterokok Tiplerinin Hastaların Yaş Gruplarına göre Dağılımı

*E. faecalis* izolatlarının çoğu, diğer türlerin izolatlarına kıyasla (4-5) yaşındaki hastalardan olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çizelge 4.3'de

enterokok izolatlarının onlardan izole edilen hastalık modellerine ve hastaların yaşına göre dağılımını gösterilmektedir.

**Çizelge 4.3** Hastaların yaşına göre izole edilen enterokok türleri

| Yaş (yıl) | Enterokok izolatları | | | | | | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. faecalis* | | Diğer türler | | Toplam | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | |
| 10 + | 8 | 53,3 | 7 | 46,7 | 15 | 100 | 0,13 |
| 8-9 | 11 | 91,7 | 1 | 8,3 | 12 | 100 | |
| 6-8 | 3 | 50 | 3 | 50 | 6 | 100 | |
| <5 | 8 | 27,7 | 3 | 27,3 | 11 | 100 | |

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, Murray (1990)'nin enterokok bakterilerinin yeni doğanlar dışında yetişkinlerde ve yaşlılarda çocuklara göre daha yaygın olduğunu tespit eden çalışmaları ile uyumludur.

Huycke *et al.* (1991) tarafından yapılan çalışmada, *E. faecalis* izolatları ile enfeksiyondan kaynaklanan bakteriyemi vakaları ile enfekte hastaların ortalama yaşı (15±60) arasında anlamlı bir fark olmadığını doğrulamıştır. Toye *et al.* (1998), hastaların yaş ortalaması ile sırasıyla (20,3±55,6) ve (8,5±55) yaşlarındaki sağlıklı denekler arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

## 4.4 Hasta Tiplerine göre Izole Edilen Enterokok Tiplerinin Dağılımı

Çizelge 4.4, ayakta hastalardan elde edilen toplam *E. faecalis* izolatlarının yatan hastalardan elde edilen izolatlardan daha fazla olduğunu (%84,6'ya karşı %61,3), ancak aralarında istatistiksel olarak önemsiz bir fark olduğunu göstermektedir.

Aynı şekilde yatan hastalardan elde edilen diğer izolatların toplamı ayaktan hastalardan daha fazladır (%38,7'ye karşı %15,4), ancak yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Ayrıca yatan hastalardan enterokok bakterilerinin toplam izolasyon oranının ayakta hastalardan daha yüksek olduğunu göstermektedir (%14,5'e karşı %10) (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4** Hasta tipine göre izole edilmiş enterokok tipleri

| Hasta tipi | Enterokok izolatları | | | | | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. faecalis* | | Diğer türler | | İzolasyon Oranı | |
| | Sayı | % | Sayı | % | | |
| Ayakta tedavi gören (n=130) | 11 | 84,6 | 2 | 15,4 | 13 (10%) | 0,4 |
| Yatan hasta (n=213) | 19 | 61,3 | 12 | 38,7 | 31 (%14,5) | |

Enterokok izolatlarının hastaneler arasında ve hastane içinde yayılma ve dolayısıyla hastanede yatan hastalara bulaşma özelliğinin yanı sıra bu mikropların hastalarda hastaneden taburcu olduktan sonra haftalar, aylar hatta yılları aşan uzun süreler kalabilme yetenekleri vardır, klinik semptom göstermez ve bu da topluma bulaşma riskini artırır. Enfekte hasta tekrar hastanelere girdikten sonra (Cetinkaya *et al.* 2000, Liassine *et al.* 1998) bu bakterilerin hem hastanede yatan hem de taburcu edilen hastalarda hastalık olmadan kolonize olduğunu bulan mevcut çalışmanın sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir.

Enterokokal bakterilerin, bağırsak yolunun doğal florasının bir parçası olan kolonilerden iç kaynaklı veya dışkı ile kontaminasyon ve diğer canlılarla temas yoluyla bulaşarak dış kaynaklı enfeksiyonlara neden olma fırsatlarından yararlandıkları bilimsel olarak belgelenmiştir. Enfekte kişi veya besin zinciri yoluyla bulaşta özellikle vankomisine dirençli izolatlar olmak üzere yatan hastalara olduğu kadar taburcu edilen hastalara da yayılım devam etmektedir (Mundy *et al.* 2000, Harbarth *et al.* 2002).

Çalışmamızın sonuçları, yatarak tedavi gören hastaların dışkılarından izole edilen *E. faecalis* izolatlarının ayakta izole edilenlerden daha fazla olduğunu gösteren Murray (1990)'nin çalışmasıyla aynı fikirde değildir (%80'e karşı %48,3). Bu fark, mevcut çalışmaya dahil edilen örneklerin doğasından kaynaklanabileceği gibi, söz konusu çalışmada bu izolatların artan enfeksiyonu ile ilişkili farklı faktörlerden de kaynaklanabilir; bunlar arasında hastanelerde uzun süre kalma, antibakteriyel basınca maruz kalma ve hastanın bağışıklığının baskılanması sayılabilir (Grayson *et al.* 1999). Gambarotto *et al.* (2000) yapmış oldukları çalışmada, hastanede yatan hastaların dışkılarından izole edilen *E. faecalis* dışındaki VRE izolatlarının ayakta tedavi gören

hastalardan daha yüksek olduğunu doğrulamıştır (%37'ye karşı %11,8) ve bu sonuç çalışmamız ile uyumluluk göstermektedir.

## 4.5 Enterokok Izolatları için Virülans Faktörleri

### 4.5.1 Hemolitik enzim üretimi: hemolizin üretimi

Çizelge 4.5'te üç tip hemolitik enzimi üreten izolatların sayı ve yüzdeleri gösterilmektedir; enzim üretmeyen izolatların en yüksek yüzdesi Gama (%50) türündendir ve bunu enterokok üreten izolatlar izlemektedir. Beta türünden enzim (%27,3) ve Alfa türünden enzim üreten izolatlar ise en düşük yüzdeye (% 22,7) sahiptir.

**Çizelge 4.5** Kusurlu kok üreten hemolitik enzim türlerinin sayıları ve yüzdeleri

| Özellik | % | İzolat sayısı |
|---|---|---|
| Gama hemolizin | 50 | 22 |
| Alfa hemolizin | 22,7 | 10 |
| Beta hemolizin | 27,3 | 12 |
| Toplam | 100 | 44 |

Bu bağlamda mevcut çalışmanın sonuçları, çoğu enterokok bakterisinin hemolizin, yani hemolitik olmayan (Gama tipi) üretmediğini, izolatlarının birkaçının ise alfa tipi hemolizin ürettiğini gösteren çalışmalarla uyumludur. Bazı izolatlar kısmi hemoliz ve tamamen hemolizli beta-hemolizin üretir (Collee *et al.* 1989, Manero and Blanch 1999). Mevcut çalışma, Hanna *et al.* (2002)'nın alfa, beta ve gama tipi (üretmeyen) hemolizin üreten enterokok bakteri yüzdesinin 3 (%11), 9 (%33,3) ve 15 (%55,5) olduğunu göstermiştir. Hancock and Gilmore (2006) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları, enterokok bakterileri tarafından hemolizin enzimi üretiminin (%45-60) arasında değiştiğini belirtmektedir ve bu durum Semedo *et al.* (2003) çalışması ile de uyumludur.

## 4.6 Enterokok Türleri Tarafından Hemolitik Enzim Üretimi

Çizelge 4.6'da hemolitik enzim üreten enterokok türlerinin sayılarını ve yüzdelerini göstermektedir. Sonuçlar, *E. faecalis* izolatlarının sırasıyla; gama (%40), beta (%33,3) ve alfa (%26,7) tipi olduğunu göstermiştir. *E. faecium* izolatları sırasıyla gama (%60), alfa (%20) ve beta (%20) dağılım göstermiştir. *E. gallinarium*'un 3 izolatı, *E. avium*'un ise1 izolatı Gama tipindedir.

**Çizelge 4.6** Enterokok türleri tarafından hemolitik enzim üretimi

| **Hemolizin çeşidi** | **Enterokok türleri** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecium*** | | ***E. avium*** | | ***E. gallinarium*** | | ***E. faecalis*** | |
| | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** |
| Alfa | 2 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 26,7 |
| Beta | 2 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 33,3 |
| Gama | 6 | 60 | 1 | 100 | 3 | 100 | 12 | 40 |
| Toplam | 10 | 100 | 1 | 100 | 3 | 100 | 30 | 100 |

Mevcut çalışmanın sonuçları, Japon araştırmacılardan oluşan bir ekip tarafından yürütülen ve (106) *E. faecalis* izolatının 58'inin (%60) farklı ülkelerden izole edildiğini doğrulayan çalışma da dahil olmak üzere, dünyanın farklı bölgelerinde yürütülen birçok çalışmaya benzerlik göstermiştir. Hastalık modellerinde hemolizin üreten ve geri kalan izolatlar verimsizken, sağlıklı deneklerden alınan 24 *E. faecalis* izolatının 4'ü (%17) enzim üretmiştir (Ike *et al.* 1987). Huycke *et al.* (1991), bakteriyemi vakalarından izole edilen toplam 190 *E. faecalis* izolatının 85'inin (%44), diğer enzim üretmeyen izolatlara kıyasla hemolizin ürettiğini göstermiştir. Desai *et al.* (2001), farklı hastalık modellerinden izole edilen *E. faecalis* izolatlarının (%58) ve *E. faecium* izolatlarının (%40) beta hemolizin üreticisi olduğunu bulmuşlardır. Toplam 202 farklı patojenik izolatın 38'ini (%18) enterokok bakterilerinin saf izolatları oluşturmuştur. Geri kalan izolatlar hemolizin için bu enzimi üretebilecek Gram-negatif bakterilerle karışık enfeksiyonlara neden olurken, *E. avium* ve *E. gallinarium* izolatları gama tipinde herhangi bir enzim üretmez ve bu da gama tipine yakındır.

Hanna *et al.* (2002) çalışmasının sonuçları da hastalıklı modellerden izole edilen *E. faecalis* izolatlarının hemolizin üreten alfa, beta ve Gamma üretmediğini göstermiştir. Ayrıca 19 *E. gallinarium* izolatının 2'sinde (%100) enzim üretememesi de mevcut çalışmanın sonuçları ile uyumludur. *E. faecium* izolatları ise 2 (%33,3) oranında beta-hemolizin ve 4 (%66,7) oranında gamma ve alfa-enzim üretmemiştir. Mevcut çalışmada alfa tipi enzimin bu izolatlarının üretilmesi, bu enzimin üretimini kodlayan plazmitin, onu üreten izolatlardan bu bakterilerin üretmeyen izolatlarına aktarılma olasılığından kaynaklanıyor olabilir (Ike *et al.* 1987).

Mevcut çalışma, bakteriyemiye neden olan *E. faecium* izolatlarının hemolizin üretemediğini gösteren Coque *et al.* (2005) çalışmasıyla benzer sonuçlar göstermemiştir. Enzimin üretimi test edilirken dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biri koyun kanı kullanılmamasıdır çünkü enterokok bakterilerinin tüm izolatları bulunan litik faktöre duyarlı olmadıkları için koyunların kırmızı kan hücrelerini bozmazlar (Jett *et al.* 1994). Ayrıca bu beta hemolizin üreten bakterilerin bazı izolatları insan kanından hazırlanan kanlı agar besiyerinde 48 saat inkübasyon sonrasında bu sonucu vermiş ve bu durum yukarıda bahsedilen çalışmalarla doğrulanmıştır (Ike *et al.* 1987, Huycke *et al.* 1991).

## 4.7 Enterokok Türlerine göre Ayrılan Diğer Virülans Faktörleri

Çizelge 4.7'deki sonuçlar, *E. faecalis* izolatlarının 25'inin (%83,3) gallinaz ürettiğini, izolatların 23'ünün (%76,7) beta-laktaz ürettiğini ve biyofilm ve aglütinat kırmızı oluşturma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Kan hücreleri ve izolatların 24'ü (%80) epitel hücrelerine yapışma yeteneğine sahipken, izolatların 8'i (%26,7) kapsüler yapıya sahiptir. *E. faecium* izolatlarının ise %7'si (%70) biyofilm oluşturma yeteneğine, 6'sı (%60) ise galatinaz ve beta-laktaz enzimi üreticisi olup, epitel hücrelerine yapışma yeteneğine sahiptir. İzolatların 4'ü (%40) kırmızı kan hücrelerini aglütine etme yeteneğine sahiptir ve 1 izolat (%10) kapsül içermektedir. Çizelge 4.7'de ayrıca tüm *E. gallinarium* izolatlarının beta-laktaz enzimi üretme ve ayrıca biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu ve sadece 2'sinin (%66,7) epitel hücrelerine yapışma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Sonuçlar ayrıca *E. avium*'un tek izolatının biyofilm

oluşturabildiğini, epitelyal hücrelere yapışabildiğini ve kırmızı kan hücrelerini aglütine edebildiğini göstermiştir.

**Çizelge 4.7** Enterokok türlerine göre ayrılan diğer virülans faktörleri

| Özellik | | | İzole enterokok türleri | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. gallinarium* (n=3)** | | ***E. faecalis* (n=30)** | | ***E. faecium* (n=10)** | | ***E. avium* (n=1)** | |
| | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** | **Sayı** | **%** |
| Yapışma | 2 | 66,7 | 24 | 80 | 6 | 60 | 1 | 100 |
| Kapsül | 0 | 0 | 8 | 26,7 | 1 | 10 | 0 | 0 |
| B-laktamaz | 3 | 100 | 23 | 76,7 | 6 | 60 | 0 | 0 |
| Jelatinaz | 0 | 0 | 25 | 83,3 | 6 | 60 | 0 | 0 |
| Aglütinasyon | 0 | 0 | 23 | 76,7 | 4 | 40 | 1 | 100 |
| Biyofilmler | 3 | 100 | 23 | 76,7 | 7 | 70 | 1 | 100 |

Patolojik ve epidemiyolojik çalışmalar, *Enterococcus* cinsinin iki türü *E. faecalis* ve *E. faecium* ile ilgilidir, çünkü bu cinsten kaynaklanan enfeksiyonların çoğuna, antimikrobiyallere karşı çoklu dirençlerine ek olarak bu iki tür neden olur (Moellering 1998, Prakash *et al.* 2005). Enterokokal bakteriler, doğrudan veya dolaylı olarak konakçı dokuların yıkımına katkıda bulunan ve böylece virülanslarını ve patojenitelerini artıran birçok özelliğe sahiptir (Eaton and Gasson 2001, Kayaoglu and Ørstavik 2004).

Çizelge 4.7'e bakıldığında, mevcut çalışmaya dahil edilen izolatlar için galatinaz enzimi üretim sonuçları, Hanna *et al.* (2002) bu enzimin üretimini bulan çalışması da dahil olmak üzere birçok çalışma ile uyumludur. Kayaoglu and Ørstavik (2004) çalışmasında patojenik *E. faecalis* izolatlarının galatinaz üretme yeteneğine (%45-68) sahip olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde, Gülhan *et al.* (2006) çalışmasında, 29 patojenik *E. faecalis* izolatından 7'sinin (%58,6) enzim üreticisi olduğu belgelenmiştir. Jett *et al.* (1994), bu tip izolatların %63,7'sinin glatinaz ürettiğini ve üretiminin bu izolatlarda, özellikle hastanelerden izole edilenlerde yaygın olduğunu belirtmişlerdir.

Enterokok bakterilerinin beta-laktaz enzimi üretme yeteneği ile ilgili olarak elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan bazı çalışmalar ile uyumluluk göstermiştir (Murray 1997, Rice 2001, Jawetz 1956). Diğer bazı çalışmalar da bu bakterilerin bu enzimi üretemediklerini göstermiştir (Huycke *et al.* 1991, Grayson *et al.* 1999, Naas *et al.* 2005).

## 4.8 Enterokok İzolatlarının Antimikrobiyallere Duyarlılığı

Çizelge 4.8'de, enterokok izolatlarının çalışmada kullanılan antibakteriyellere duyarlılığını göstermektedir. İzolatlar en yüksek duyarlılığı 35 izolatla (%97,5) nalidiksik asite göstermiş, bunu siprofloksasin ve amoksasilin/klavulanik asit izlemiştir. İzolatların rifadin 16 (%36,4), penisilin 12 (%27,3), methprim triplet 10 (%22,7) ve vankomisine ise 5 (%11,4)'tir. Diğer taraftan, elde edilen sonuçlar tüm izolatların eritromisin, kloksasilin, sefotoksim, amoksasilin ve tetrasikline dirençli olduğunu ortaya koymuştur.

Ayrıca, *E. fecalis* izolatlarının antimikrobiyallerde kullanılan antimikrobiyallere duyarlılığı gibi, antimikrobiyallere duyarlı enterokok türlerinin sayılarını ve yüzdelerini de göstermiştir. Çalışmamızda %25 (%83,3) nalidiksik asit, %18 (%60) siprofloksasin, %16 (%53,3) amoksasilin + Klavulanik asit, rifadin için %11 (%36,7), penisilin için %7 (%23,3) ve Trimetaprim için %6 (%20) olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlarda vankomisin, kloksasilin, sefotoksim, amoksasilin, tetrasiklin ve eritromisin direnci saptanmıştır.

*E. faecium* izolatları en çok lamoksasilin + klavulanik asit (%80), nalidiksik asit %7 (%70), siprofloksasin %7 (%70), rifadin %5 (%50), penisilin %4 (%40), ve metpramit (3) %30 ve vankomisine 2 (%20) karşı dirençli iken tüm izolatlar kloksasilin, sefotoksim, ampisilin, tetrasiklin ve eritromisine dirençlidir.

Tüm *E. gallinrium* izolatları vankomisin ve amoksasilin + klavulanik aside (%100) duyarlıydı. İki izolat nalidiksik aside (%66,7), bir izolat siprofloksasin ve methramide (%33,3) duyarlı, tüm izolatlar rifadin, penisilin, kloksasilin, sefotoksim, ampisilin, tetrasiklin ve eritromisine dirençlidir.

*E. avium* izolatı siprofloksasin, nalidiksik asit ve penisiline duyarlı iken, diğer antimikrobiyallere dirençliydi.

**Çizelge 4.8** Enterokok izolat türlerinin antimikrobiyallere duyarlılığı

| Antibiyotik Duyarlılık | | | İzole enterokok türleri | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. avium* (n=1) | | *E. faecalis* (n=30) | | *E. faecium* (n=10) | | *E. gallinarium* (n=3) | | Toplam izolatlar (n=44) | |
| | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| Amoksasilin + Klavulanik Asit | 0 | 0 | 16 | 53,3 | 8 | 80 | 3 | 100 | 27 | 61,4 |
| Vankomisin | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 20 | 3 | 100 | 5 | 11,4 |
| Trimetoprim | 0 | 0 | 6 | 20 | 3 | 30 | 1 | 33,3 | 10 | 22,7 |
| Kloksasilin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Siprofloksasin | 1 | 100 | 18 | 60 | 7 | 70 | 1 | 33,3 | 27 | 61,4 |
| Sefotaksim | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Rifampisin | 0 | 0 | 11 | 36,7 | 5 | 50 | 0 | 0 | 16 | 36,4 |
| Amoksasilin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Nalidiksik Asit | 1 | 100 | 25 | 83,3 | 7 | 70 | 2 | 66,3 | 35 | 79,4 |
| Tetarsiklin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Penisilin | 1 | 100 | 7 | 23,3 | 4 | 40 | 0 | 0 | 12 | 27,3 |
| Eritromisin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Bu sonuçlar, araştırmacı Hanna *et al.* (2002) patojenik enterokok bakterilerinin tetrasiklin ve eritromisine dirençli (%100) olduğunu gösteren yerel çalışmasının sonuçlarına benzerken, mevcut sonuçlar araştırmacının çalışmasından farklıydı. Tüm izolatların penisilin ve nalidiksik aside dirençli ve sırasıyla Rifadin (%81,4), Trimetprim (%55,5) ve Vankomisin (%70,3) antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlendi. Bunun nedeni, çalışmaya dahil edilen patolojik örneklerin doğası ve bu mikropların birçok antibiyotiğe direnç kazanma olasılığı olabilir.

Mevcut çalışmada enterokok izolatları, amoksasilin, sefotaksim, kloksasilin ve penisilin dahil olmak üzere beta-laktam antibiyotiklere karşı yüksek direnç göstermiştir. Bu direnç, bu bakterilerin birçok izolatında bulunan ve bu antijenlerin çoğunun ortalama konsantrasyonlarında bile hücre duvarlarının sentezini tamamlamalarına yardımcı olan PBP5 de dahil olmak üzere PBP ile ilişkili proteinlere dirençli izolatlara veya dirençli izolatların petalaktaz enzimini üretme kabiliyeti ile ilişkilendirilebilir (Moellering 1998, Rice 2001).

İzolatlar, amoksasilin ve klavulanik asit karışımına karşı duyarlıyken, bu çalışmada kullanılan anti-petalaktaza dirençli olarak bulunmuştur (Jawetz 1956).

İzolatlar, nalidiksik asit ve siprofloksin tarafından temsil edilen anti-kinolonlara karşı en yüksek duyarlılığı göstermiştir ve bu antibiyotiklerin etkinliği, DNA sarmalının bu işlevden sorumlu DNA giraz enzimini inhibe etmesi nedeniyle süper sarma yoluyla önlenmesinden kaynaklanmaktadır (Baron *et al.* 2003). Udo *et al.* (2003) çalışmasında, patojenik enterokok bakterilerinin %60'ının siprofloksine duyarlı olduğunu doğrulamıştır ve bu, mevcut çalışmanın sonuçlarıyla tutarlıdır. Mevcut çalışmanın sonuçları, bu antibiyotiğin bu bakterilerle enfeksiyondan kaynaklanan idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmede en etkili olduğunu gösteren çalışmalarla örtüşürken, buna dirençli izolatların ortaya çıkması nedeniyle Rifadin'in etkisiz olduğunu, ancak başka bir etkili antibiyotik ile karıştırılarak kullanılabileceğini göstermektedir (Murray 1990, Cetinkaya *et al.* 2000).

Son yirmi yılda, enterokokal bakteriler, D- üretimini kodlayan Van A, B, C, D ve E olarak bilinen bir grup genin aktivitesinin bir sonucu olarak, glikopeptidlere, özellikle vankomisine karşı direnç kazanmıştır. Bu bakterilerin hücre duvarının birincil bileşenlerinden olan D-alanin-D-alanin, bu antijenlerin alternatif yapılarının hedef bölgelere bağlanamamasına ve dolayısıyla dirençli izolatların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Dutka-Malen *et al.* 1995, Grayson *et al.* 1999). Mevcut çalışmanın sonuçları, ABD'de Eigner *et al.* (2005) çalışması da dahil olmak üzere, bakteri izolatlarının anti-vankomisin direncinin diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir; bu çalışma, VRE izolatlarının yüzdesinin (%25-50) olduğunu bulmuştur. Hanna *et al.* (2002) çalışmasında VRE izolatlarının yüzdesi %52 olarak bulunmuştur. Bu durum, VRE izolatlarının hastanelere yerleşmesi ve topluma yayılması ile plazmit ve transoksonlarda taşınan bu direnci kodlayan genlerin hassas izolatlara aktarılarak dirençli hale getirilerek yüksek oranda dirençli hale gelmesine bağlanabilir (Bonten *et al.* 2001, Naas *et al.* 2005, Novais *et al.* 2005).

## 4.9 Enterokokların Biyofilm Oluşumuna ve Antimikrobiyallere Duyarlılığı

Çizelge 4.9'da enterokok izolatlarının biyofilm oluşumuna ve çalışmada kullanılan antimikrobiyallere duyarlılığı göstermektedir. Sonuçlar, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmayan izolatların, biyofilm oluşturma yeteneği gösteren izolatlara kıyasla (%70'e

karşı %14,7) penisiline karşı istatistiksel olarak anlamlı bir farkla (P=0,002) daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Genel olarak biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmayan izolatlar, hem rifadin, nalidiksik asit hem de amoksasilin + klavulanik aside, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip izolatlara göre daha duyarlıdır.

**Çizelge 4.9** Enterokokların biyofilm ve antimikrobiyallere duyarlılığı

| **Antimikrobiyal duyarlılık** | **Biyofilm oluşumu** | | | | **P değeri** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Pozitif (n= 34)** | | **Negatif (n=10)** | | |
| | **Sayı** | % | **Sayı** | % | |
| Trimetoprim | 8 | 23,5 | 2 | 20 | 1 |
| Amoksasilin+Klavulanik | 20 | 58,8 | 7 | 70 | 0,72 |
| Penisilin | 5 | 14,7 | 7 | 70 | 0,002 [S] |
| Nalidiksik Asit | 26 | 76,5 | 9 | 90 | 0,66 |
| Vankomisin | 5 | 14,7 | 0 | 0 | 0,57 |
| Siprofloksasin | 21 | 61,8 | 6 | 60 | 1 |
| Rifampisin | 12 | 35,3 | 4 | 40 | 1 |

*[S] = Önemli

Bu çalışmanın bulguları genel olarak diğer çalışmaların bulguları ile örtüşmektedir. Biyofilm oluşturma yeteneğine sahip enterokok izolatlarının, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmayan izolatlara göre antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğunu doğrulamıştır (Van Merode *et al.* 2006).

Kristich *et al.* (2004) çalışmasında da biyofilm oluşturan *E. faecalis* izolatlarının, membran oluşturmayan izolatlara kıyasla vankomisine ve teikoplanine karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Raad *et al.* (2005), bakteriyemiye neden olan ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *E. faecium* izolatlarının QD, Linozolid, Minosiklin'e duyarlı olduğunu göstermiş ve çalışma, izolatların duyarlılığına rağmen duyarlı olmadıklarını doğrulamıştır. Bu, biyofilme sahip izolatların duyarlılığını gösteren, ancak önemli olmayan farklılıklar gösteren mevcut çalışmanın sonuçlarına benzemektedir. Ramadhan and Hegedus (2005) çalışmasında bu bakterilerin izolatlarının biyofilm oluşumu ile anti-vankomisin duyarlılığı veya direnci arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

## 4.10 Epitel Hücrelerine Yapışma ve Antimikrobiyallere Karşı Duyarlılık

Çizelge 4.10'da enterokok izolatlarının epitel hücrelerine yapışma yetenekleri ile antimikrobiyallere duyarlılıkları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Ayrıca epitel hücrelerine yapışma özelliği olmayan izolatlar vankomisin, siprofloksasin, nalidiksik asit ve amoksasilin + klavulanik aside en duyarlı izolatlar olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmamıştır. Oysa epitel hücrelerine yapışma özelliği olan izolatlar, epitel hücrelerine yapışma yeteneği olmayan izolatlara göre hem rifadin hem de methbrim üçlüsüne karşı daha fazla duyarlılık göstermiştir.

**Çizelge 4.10** Epitel hücrelerine yapışma ve antimikrobiyallere karşı duyarlılık arasındaki ilişki

| **Antimikrobiyal duyarlılık** | **Epitel hücrelerine yapışma** | | | | **P değeri** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Negatif (n=11)** | | **Pozitif (n= 33)** | | |
| | **Sayı** | % | **Sayı** | % | |
| Vankomisin | 2 | 18,2 | 3 | 9,1 | 0,59 |
| Nalidiksik Asit | 9 | 81,8 | 26 | 78,8 | 1 |
| Siprofloksasin | 7 | 63,6 | 20 | 60,6 | 1 |
| Penisilin | 6 | 54,5 | 6 | 18,2 | 0,045 **[S]** |
| Rifampisin | 3 | 27,3 | 13 | 39,4 | 0,72 |
| Trimetoprim | 2 | 18,2 | 8 | 24,2 | 1 |
| Amoksasilin + Klavulanik | 9 | 81,8 | 18 | 54,5 | 0,16 |

*[S] = Önemli

Yapılan çalışmalarda, enterokok bakterilerinin yapışma mekanizmaları üzerine yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen, epitel hücrelerine tutunma kapasiteleri ile antimikrobiyallere karşı dirençleri arasındaki ilişkiyi ele alınmamıştır. Bu, birden fazla mekanizmanın yapışma sürecine katılımına bağlanabilir, çünkü bu bakteriler birden fazla yapışma mekanizmasına sahiptir (Jett *et al.* 1994, Hancock and Gilmore 2006). Örneğin, ESP proteinlerinin (adhezyon mekanizmalarından biri) üretimini ifade eden izolatların, ampisilin ve vankomisine dirençli izolatlarla daha yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (Leavis *et al.* 2004). Ayrıca bu bakteriler için başka bir yapışma mekanizmasını ifade eden izolatların aminoglikozitlere karşı direnç ile ilişkili olduğu da bulunmuştur (Mundy *et al.* 2000). Bu sonuçlar, ampisiline bağlanma yeteneğine sahip izolatların duyarlılığında, bu yeteneğe sahip olmayan izolatlara kıyasla önemli bir fark olduğunu gösteren mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Çalışmamızda anti-vankomisine duyarlılıktaki

istatistiksel farka anlamlı olmasada bu durum Harrington *et al.* (2004) çalışmasında, ESP'nin kısmen anti-vankomisine dirençli izolatların yayılmasıyla ilişkili olması ile uyumluluk göstermiştir.

## 4.11 Kapsüler Kusurlu Kok İzolatları ve Antimikrobiyallere Duyarlılık

Çizelge 4.11'de kapsülün enterokok izolatlarına sahip olması ile çalışmada kullanılan antimikrobiyallere duyarlılıkları arasındaki ilişkiyi göstermektedir; sonuçlar, kapsül olmayan tüm izolatların, kapsülü içeren izolatlara kıyasla penisiline daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Genel olarak, kapsül içermeyen izolatlar, vankomisin, siprofloksasin, amoksasilin + klavulanik asit ve methprim trihidrat'a, kapsüler izolatlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaksızın daha duyarlıyken, kapsüler izolatlar, rifadin ve nalidiksik aside en duyarlı olanlardır.

**Çizelge 4.11** Kapsül bulundurma ve antimikrobiyallere karşı duyarlılık arasındaki ilişki

| **Antimikrobiyal duyarlılık** | **Kapsül varlığı** | | | | **P değeri** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Negatif (n=35)** | | **Pozitif (n= 9)** | | |
| | % | **Sayı** | % | **Sayı** | |
| Rifampisin | 31,4 | 11 | 55,6 | 5 | 0,25 |
| Siprofloksasin | 62,9 | 22 | 55,6 | 5 | 0,72 |
| Nalidiksik Asit | 77,1 | 27 | 88,9 | 8 | 0,66 |
| Vankomisin | 11,4 | 4 | 11,1 | 1 | 1 |
| Trimetoprim | 25,7 | 9 | 11,1 | 1 | 0,66 |
| Penisilin | 34,3 | 12 | 0 | 0 | 0,045 **[S]** |
| Amoksasilin + Klavulanik | 65,7 | 23 | 44,4 | 4 | 0,28 |

*[S] = Önemli

Çalışmalar, anti-vankomisine dirençli veya duyarlı olan bazı enterokok bakteri izolatlarının kapsüler olduğunu doğrulamıştır (Huebner *et al.* 1999). Bu durum, kapsül içeren izolatların antijene duyarlılığı veya direncinde önemli bir fark göstermeyen diğer çalışmaların sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir. Bilimsel literatürü takip ederek, önceki çalışmalarda bu kapsül bakterilerinin izolatlarının diğer antimikrobiyallere duyarlılığı belirlenmemiştir. Oysa mevcut çalışmamızda, kapsülsüz izolatların, kapsül içeren izolatlara göre penisilin antikoruna anlamlı bir farkla daha duyarlı olduğunu ve bu durumun, kapsülün bu bakterilerin virülansına katkı göstermesinden kaynaklandığı görülmektedir.

## 4.12 Enterokok Türleri ve Antimikrobiyallere Duyarlılık

Çizelge 4.12'de izole edilen enterokok türleri ile çalışmada kullanılan antibakteriyellere duyarlılık arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bun göre, tüm *E. faecalis* izolatlarının diğer izolat türlerine kıyasla vankomisine duyarsız yani dirençli olduğu tespit edilmiştir *E. faecalis* izolatları rifadin ve nalidiksik aside diğer izolatlara oranla daha duyarlıdır. Düşük *E. faecalis* izolatları ise siprofloksasin, penisilin, amoksasilin + klavulanik asit ve methprim üçlüsüne duyarlı, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıklara sahiptir.

**Çizelge 4.12** Enterokok türleri ve antibakteriyellere duyarlılık

| **Antimikrobiyal duyarlılık** | **Enterokok türleri** | | | | **P değeri** |
|---|---|---|---|---|---|
| | ***E. faecalis* (n= 30)** | | **Diğer türler (n=14)** | | |
| | **Sayı** | % | **Sayı** | % | |
| Trimetoprim | 6 | 20 | 4 | 28,6 | 0,7 |
| Amoksasilin + Klavulanik | 16 | 53,3 | 11 | 78,6 | 0,18 |
| Penisilin | 7 | 23,3 | 5 | 35,7 | 0,48 |
| Vankomisin | 0 | 0 | 5 | 35,7 | **0,002 [S]** |
| Siprofloksasin | 18 | 60 | 9 | 64,3 | 1 |
| Nalidiksik Asit | 25 | 83,3 | 10 | 71,4 | 0,43 |
| Rifampisin | 11 | 36,7 | 5 | 35,7 | 1 |

*[S] = Önemli

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, Hanna *et al.* (2002) ve Eigner *et al.* (2005) yapmış oldukları çalışmaların sonuçlarıyla farklılık göstermiştir. Bu farklılığın nedeni de antijene karşı direnç özelliğinin, gerek genetik mutasyonlar yoluyla, gerekse hastanelerde endemik olan ve genellikle antijene karşı direnç özelliği taşıyan izolatlardan taşıyıcı elementler yoluyla kazanılmasından ve yayılımın giderek artmasından kaynaklanmaktadır (Austin *et al.* 1999, Murray 2000).

Enterokok izolatlarının çoklu ikametgahı, bağırsak yolunda doğal olarak bulunan bakterilerin bir parçası olmaları ve dolayısıyla bu bölgede bulunan ve enterokoklara bulaşabilecek direnç genlerini taşıyabilen birçok bakteri ile doğrudan temas halinde olmaları gerçeğiyle açıklanmaktadır. Ayrıca konjugasyon yoluyla, stafilokoklar da dahil

olmak üzere gastrointestinal sistem dışında bulunan Gram-pozitif bakterilerden direnç elde etmek mümkündür (Moellering 1998).

*E. faecalis* izolatlarının anti-kinolonlara duyarlılığı, diğer izolat türlerinin izolatlarının duyarlılığı ile karşılaştırıldığında anti-kinolonlara duyarlılığın daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *E. faecalis* izolatlarının anti-siprofloksine (%40), diğer türlerin ise (%34) dirençli olduğunu gösteren Udo *et al.* (2003) çalışmasıyla uyumluluk göstermiştir.

Öte yandan, çalışmalar *E. faecium* izolatlarının *E. faecalis* izolatlarına göre daha fazla çoklu antibiyotik direncine sahip olduğunu doğrulamıştır (Eaton and Gasson 2001). Ancak, çalışmanın sonuçları bu çalışmalarla aynı fikirde değildi. Bu, tüm *E. faecalis* izolatlarının içsel ve kazanılmış direnç nedeniyle vankomisin antikoruna dirençli olmasına ve VRE izolatlarının aminoglikozitler, beta-laktamlar, glikozitler ve makrolidler dahil diğer antibiyotiklere direnç gösterme yeteneği göstermesine bağlanabilir (Mundy *et al.* 2000, Liassine *et al.* 1998). Bu durum, *E. faecalis*'in VRE izolatlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlılığını ve direncini açıklasa da diğer türlerin izolatları ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

### 4.13 Galatinaz Enziminin Üretimi ve Antimikrobiyallere Duyarlılık

Çizelge 4.13'te galatinaz enzim üretimi ile çalışmada kullanılan antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişkinin sonuçları gösterilmektedir. Bu enzimi üreten izolatlarla karşılaştırıldığında, enzimi üretmeyen izolatların Trimetaprim'e istatistiksel olarak anlamlı bir farkla en duyarlı olduğu bulunmuştur (P=0,04).

Öte yandan, enzim üretmeyen izolatlar vankomisin, siprofloksasin, rifadin, penisilin ve amoksasilin + klavulanik aside enzim üretmeyen izolatlara göre istatistiksel olarak önemsiz farklarla daha duyarlı iken, enzim üreten izolatlar nalidiksik aside (%80,6'ya karşı %76,9) enzim üretmeyen izolatlara kıyasla istatistiksel olarak daha duyarlıdır.

**Çizelge 4.13** Jelatinaz üretimi ile antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki

| Antimikrobiyal duyarlılık | Jelatinaz üretimi | | | | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|
| | Negatif (n=13) | | Pozitif (n= 31) | | |
| | % | Sayı | % | Sayı | |
| Vankomisin | 23,1 | 3 | 6,5 | 2 | 0,14 |
| Nalidiksik Asit | 76,9 | 10 | 80,6 | 25 | 1 |
| Siprofloksasin | 69,2 | 9 | 58,1 | 18 | 0,74 |
| Rifampisin | 38,5 | 5 | 35,5 | 11 | 1 |
| Trimetoprim | 46,2 | 6 | 12,9 | 4 | **0,043 [S]*** |
| Penisilin | 38,5 | 5 | 22,6 | 7 | 0,3 |
| Amoksasilin + Klavulanik | 76,9 | 10 | 54,8 | 17 | 0,2 |

*[S] = Önemli

Çalışmamızda Jelatinaz üretmeyen izolatların, enzim üreten izolatlara göre antimikrobiyallere daha duyarlı olduğu ve bu sonucun bakterilerin virülansını arttırmada önemli bir rol oynayabileceğine işaret edebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız bu ilişki açısından benzersiz olabilir, çünkü literatür araştırmalarında Jelatinaz için enterokok bakterilerinin üretimi ve antimikrobiyallere dirençleri arasındaki ilişkinin boyutunu tespit etmeye yönelik yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamakrtadır.

## 4.14 Beta-Laktaz Enziminin Üretimi ve Antimikrobiyallere Duyarlılık

Çizelge 4.14'te beta-laktaz üretimi ile çalışmada kullanılan antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Bu enzimi üretmeyen izolatların penisiline karşı (%91,7) bu enzimi üreten izolatlara (%3,1) göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla ($P<0,001$) daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Ayrıca bu enzimi üretmeyen izolatlar siprofloksasin, rifadin, nalidiksik asit ve methprim üçlüsüne enzimi üreten izolatlara göre daha duyarlı bulunmuştur. Enzim üreten izolatlar, enzim üretmeyen izolatlara göre vankomisine ve amoksasilin + klavulanik aside daha duyarlıdır.

**Çizelge 4.14** Beta-laktaz üretimi ile antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki

| Antimikrobiyal Duyarlılk | B-laktamaz üretimi | | | | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|
| | Pozitif (n= 32) | | Negatif (n=12) | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | |
| Trimetoprim | 7 | 21,9 | 3 | 25 | 1 |
| Vankomisin | 4 | 12,5 | 1 | 23,1 | 1 |
| Nalidiksik Asit | 25 | 78,1 | 10 | 83,3 | 1 |
| Siprofloksasin | 19 | 59,4 | 8 | 66,7 | 0,74 |
| Rifampisin | 11 | 34,4 | 5 | 41,7 | 0,73 |
| Penisilin | 1 | 3,1 | 11 | 91,7 | **< 0,001 [S]** |
| Amoksasilin + Klavulanik | 20 | 62,5 | 7 | 58,3 | 1 |

*[S] = Önemli

Çalışmalar, beta-laktaz üreten enterokok izolatlarının, üretmeyen beta-laktam izolatlarına göre daha dirençli olduğunu doğrulamıştır (Cetinkaya *et al.* 2000, Rice 2001). Bu, enzimi üretmeyen izolatların penisiline karşı istatistiksel olarak anlamlı bir farkla daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmanın sonuçlarıyla tutarlıdır (Collee *et al.* 1989). Mevcut çalışmanın sonuçları, enzim üreten izolatların, anti-amoksasilin + klavulanik aside, enzim üretmeyen izolatlara kıyasla daha duyarlı olduğunu gösteren diğer çalışmalarla da uyumluluk göstermiştir (Murray 2000).

## 4.15 Enterokokların Biyofilm Oluşumuna ve Antimikrobiyallere Duyarlılığı

Çizelge 4.15 enterokok izolatlarının biyofilm oluşumuna duyarlılığını ve çalışmada kullanılan antimikrobiyallere duyarlılığı göstermektedir. Sonuçlar, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmayan izolatların, biyofilm oluşturma yeteneği gösteren izolatlara kıyasla (%70'e karşı %14,7) penisiline karşı istatistiksel olarak anlamlı bir farkla (P=0,002) daha duyarlı olduğunu göstermiştir.

Genel olarak biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmayan izolatlar, hem rifadin, nalidiksik asit hem de amoksasilin + klavulanik aside, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olan izolatlara göre daha duyarlı olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

**Çizelge 4.15** Enterokokların biyofilm oluşumuna ve antimikrobiyallere duyarlılığı

| Antimikrobiyal duyarlılık | Biyofilm oluşumu | | | | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|
| | Pozitif (n=34) | | Negatif (n=10) | | |
| | Sayı | % | Sayı | % | |
| Trimetoprim | 8 | 23,5 | 2 | 20 | 1 |
| Amoksasilin + Klavulanik | 20 | 58,8 | 7 | 70 | 0,72 |
| Penisilin | 5 | 14,7 | 7 | 70 | **0,002 [S]** |
| Nalidiksik Asit | 26 | 76,5 | 9 | 90 | 0,66 |
| Siprofloksasin | 21 | 61,8 | 6 | 60 | 1 |
| Vankomisin | 5 | 14,7 | 0 | 0 | 0,57 |
| Rifampisin | 12 | 35,3 | 4 | 40 | 1 |

*[S] = Önemli

Çalışmamızın sonuçları, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip enterokok izolatlarının, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmayan izolatlara göre antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğunu doğrulayan diğer çalışmalarla genel olarak uyumluluk göstermektedir (Van Merode *et al.* 2006). Kristich *et al.* (2004) çalışmasında, *E. faecalis*'in biyofilm oluşturan izolatlarının, membran oluşturmayan izolatlara kıyasla vankomisine ve teikoplanine daha dirençli olduğunu da bildirmiştir.

Raad *et al.* (2005) çalışmasında, bakteriyemiye neden olan ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *E. faecium* izolatlarının anti-QD, Linozolid, Minosiklin'e duyarlı olduğunu belirtmiştir. Bu durum, biyofilme sahip izolatların duyarlılığını gösteren, ancak önemli olmayan farklılıklar gösteren mevcut çalışmanın sonuçlarına benzerdir. Bunlara ek olarak Ramadhan and Hegedus (2005)'un çalışmasında, bu bakterileri izolatlarının biyofilm oluşumu ile anti-vankomisine duyarlılık veya dirençleri arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir.

## 4.16 Epitel Hücrelerine Yapışma ve Antimikrobiyallere Duyarlılık

Çizelge 4.16 enterokok izolatlarının epitel hücrelerine yapışma yetenekleri ile antimikrobiyallere duyarlılıkları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Ayrıca epitel hücrelerine yapışma özelliği olmayan izolatlar vankomisin, siprofloksasin, nalidiksik asit ve amoksasilin + klavulanik aside en duyarlı izolatlar olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmamıştır. Oysa epitel hücrelerine tutunma özelliği olan izolatlar,

epitel hücrelerine yapışma özelliği olmayan izolatlara göre hem rifadin hem de methprim üçlüsüne karşı istatistiksel olarak önemsiz farklılıklarla daha fazla duyarlılık göstermiştir.

**Çizelge 4.16** Epitel hücrelerine yapışma ve antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki

| Antimikrobiyal Duyarlılık | Epitel hücrelerine yapışma | | | | P değeri |
|---|---|---|---|---|---|
| | Pozitif (n= 33) | | Negatif (n=11) | | |
| | % | Sayı | % | Sayı | |
| Vankomisin | 9,1 | 3 | 18,2 | 2 | 0,59 |
| Amoksasilin + Klavulanik | 54,5 | 18 | 81,8 | 9 | 0,16 |
| Siprofloksasin | 60,6 | 20 | 63,6 | 7 | 1 |
| Trimetoprim | 24,2 | 8 | 18,2 | 2 | 1 |
| Nalidiksik Asit | 78,8 | 26 | 81,8 | 9 | 1 |
| Penisilin | 18,2 | 6 | 54,5 | 6 | 0,045 [S] |
| Rifampisin | 39,4 | 13 | 27,3 | 3 | 0,72 |

*[S] = Önemli

Enterokokal bakterilerin adezyon mekanizmaları üzerine yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen, epitel hücrelerine yapışma yetenekleri ile antimikrobiyallere karşı dirençleri arasındaki ilişkiyi ele almamışlardır. Bu durum, bakterilerin birden fazla yapışma mekanizmasına sahip olması nedeniyle, yapışma sürecine birden fazla mekanizmanın katılmasına bağlanabilir (Jett *et al.* 1994, Hancock and Gilmore 2006). Örneğin, adezyon mekanizmalarından biri olan ESP proteinlerinin üretimini ifade eden izolatların, ampisilin ve vankomisine dirençli izolatlarla daha yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (Leavis *et al.* 2004). Bu bakteriler için başka bir yapışma mekanizması ifade eden izolatların aminoglikozitlere karşı dirençle ilişkili olduğu da bulunmuştur (Mundy *et al.* 2000). Bu sonuçlar, ampisiline bağlanma yeteneğine sahip izolatların duyarlılığında, bu yeteneğe sahip olmayan izolatlara kıyasla önemli bir fark olduğunu gösteren mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Harrington *et al.* (2004) çalışmasında, ESP'nin kısmen anti-vankomisine dirençli izolatların yayılmasıyla ilişkili olduğu ile doğrulanmıştır.

## 4.17 Antimikrobiyallere Alerjik Olanlar Kapsüler Kusurlu Kok İzolatları

Çizelge 4.17 kapsüle sahip enterokok izolatları ile çalışmada kullanılan antimikrobiyallere duyarlılıkları arasındaki ilişkiyi gösterir. Tablodaki sonuçlar, kapsül olmayan tüm izolatların, kapsülü içeren izolatlara kıyasla penisiline daha duyarlı

olduğunu gösterir. Genel olarak, kapsül içermeyen izolatlar, vankomisin, siprofloksasin, amoksasilin + klavulanik asit ve methprim trihidrata, kapsüler izolatlara kıyasla daha duyarlıdır, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu, kapsüler izolatlar ise rifadin ve nalidiksik aside en duyarlıdır.

**Çizelge 4.17** Kapsüle sahip olma ve antimikrobiyallere duyarlılık arasındaki ilişki

| **Antimikrobiyal Duyarlılık** | **Kapsül varlığı** | | | | **P değeri** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Negatif (n=35)** | | **Pozitif (n= 9)** | | |
| | % | **Sayı** | **Sayı** | % | |
| Amoksasilin + Klavulanik | 65,7 | 23 | 4 | 44,4 | 0,28 |
| Trimetoprim | 25,7 | 9 | 1 | 11,1 | 0,66 |
| Siprofloksasin | 62,9 | 22 | 5 | 55,6 | 0,72 |
| Nalidiksik Asit | 77,1 | 27 | 8 | 88,9 | 0,66 |
| Penisilin | 34,3 | 12 | 0 | 0 | 0,045 **[S]** |
| Vankomisin | 11,4 | 4 | 1 | 11,1 | 1 |
| Rifampisin | 31,4 | 11 | 5 | 55,6 | 0,25 |

*[S] = Önemli

Çalışmalar, vankomisine dirençli veya duyarlı olan bazı enterokok bakteri izolatlarının kapsüler olduğunu doğrulamıştır (Huebner *et al.* 2000). Bu, kapsül izolatlarının bu antijene duyarlılığı veya direncinde önemli bir fark göstermeyen mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Bilimsel literatürü takip ederek, önceki çalışmalarda bu kapsül bakterilerinin izolatlarının diğer antimikrobiyallere duyarlılığı belirlenmemiştir. Oysa mevcut çalışmanın sonuçları, kapsülsüz izolatların, kapsül içeren izolatlara göre anlamlı bir farkla penisiline daha duyarlı olduğunu göstermiştir ve bu, kapsülün bu bakterilerin virülansına katkısına işaret edebilir.

# 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma, *E. faecalis*'in bu cinse ait türlerin neden olduğu tüm patolojik enfeksiyonlarda en yaygın türlerden biri olduğunu, ardından bunu *E. faecium, E. gallinarium* ve *E. avium*'un takip ettiği belirlenmiştir. Enterokok enfeksiyonu oranları ile enfekte hastaların cinsiyeti, yaşı ve kalitesi (gelen ve hastanede yatan hastalar) arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ayrıca, enterokok izolatlarının hemolizin enzimi, galatinaz, beta-laktaz üretimi, epitel hücrelerine yapışma, kırmızı kan hücrelerinin aglütinasyonu ve kapsüle sahip olmaları dahil olmak üzere virülanslarını artırmaya katkıda bulunabilecek faktörlere sahip olduğu belirlenmiştir.

Enterokok izolatları, penisiline karşı dirençlerini arttırarak (P=0,002) in vivo dışında bir biyofilm oluşturma yeteneğini göstermiştir. Enterokok izolatları için galatinaz enzim üretimi, bu izolatların antimikobakteri üçlüsüne direnci ile önemli ölçüde farklılığa sahiptir. Ayrıca izolatların anti-penisiline direnci ile beta-laktaz enzimi üretimi arasında anlamlı bir ilişki vardır. Bunlara ek olarak izolatların epitel hücrelerine yapışma yetenekleri ile kapsüler sahiplikleri ile penisiline dirençleri arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

Tüm izolatlar kloksasilin, sefotoksim, amoksasilin, tetrasiklin ve eritromisine karşı mutlak direnç göstermiştir. İzolat duyarlılığı açısından en iyi antibiyotikler klavulanik aside ek olarak nalidiksik asit, siprofloksin ve amoksasilin karışımı olmuştur. Ayrıca, tüm *E. faecalis* izolatlarının anti-vankomisin direnci, diğer türlerin izolatlarının direnci ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark (P=0,002) bulunmuştur.

Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde, Enterokokal bakterilerin diğer kaynaklardan (çevre, gıda, hayvan ve bitki) izolasyonu ve virülans faktörlerinin patolojik izolatlarla karşılaştırmalı olarak incelenmesi, Enterokok türlerinin hastanelerdeki prevalansının, onları ameliyathane ve doğumhaneler, lobiler, sağlık çalışanları, mutfaklar ve diğer modellerden izole edilerek incelenmesi, Bakteriyel tanı laboratuvarlarının rutin çalışmalarında bu bakterilerin hızlı teşhisi ve Gram pozitif koklardan ayırt edilmesi amacıyla merkez pivotun kullanılması, Antibiyotiklerin, özellikle multi-dirençli

enterokok izolatlarının ortaya çıkmasıyla ilişkili antibiyotiklerin optimal kullanımının gerekliliği, Vankomisine dirençli enterokokların antimikrobiyal direncini ve fenotiplerini belirlemeye yardımcı olan DNA plazmitlerini analiz etmek ve bu direncin intrinsik mi yoksa kazanılmış mı yoksa genetik mi olduğunu belirlemek için PCR tekniği gibi modern ve hızlı tekniklerin kullanılması ve enterokokal bakterilerin adezyon mekanizmalarının belirlenmesi önerilmektedir.

## KAYNAKLAR


Austin, D. J., Bonten, M. J., Weinstein, R. A., Slaughter, S. and Anderson, R. M. 1999. Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(12): 6908-6913.

Baker, F. J. and Silverton, R. E. 2014. Introduction to medical laboratory technology. Butterworth-Heinemann, 746 page, Oxford.

Baron, E. J., Murray, P. R., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. and Yolken, R. 2003. American society for microbiology. Manual of Clinical Microbiology, 6.

Bleiweis, A. S. and Zimmerman, L. N. 1964. Properties of proteinase from Streptococcus faecalis var. liquefaciens. Journal of Bacteriology, 88(3): 653-659.

Bonten, M. J., Willems, R. and Weinstein, R. A. 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. The Lancet Infectious Diseases, 1(5): 314-325.

Budzik, J. M. and Schneewind, O. 2006. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. The Journal of Clinical Investigation, 116(10): 2582-2584.

Carniol, K. and Gilmore, M. S. 2004. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in Enterococcus faecalis biofilm formation. Journal of Bacteriology, 186(24): 8161-8163.

Carvalho, M. D. G. S., Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Sampson, A. J., Joyce, K. and Facklam, R. R. 2006. Enterococcus caccae sp. nov., isolated from human stools. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(7): 1505-1508.

Casals, J. B. 1979. Tablet sensitivity testing on pathogenic fungi. Journal of Clinical Pathology, 32(7): 719-722.

Cetinkaya, Y., Falk, P. and Mayhall, C. G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. Clinical Microbiology Reviews, 13(4): 686-707.

Chow, J. W., Thal, L. A., Perri, M. B., Vazquez, J. A., Donabedian, S. M., Clewell, D. B. and Zervos, M. J. 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37(11): 2474-2477.

Collee, J. R., Scott, A. C., Duguid, J. P., Fraser, A. G. and Marmion, B. P. 1989. Mackie and McCartney practical medical microbiology. Laboratory Control of Antimicrobial Therapy, 2.

Collins, C. H. and Lyne, P. M. 1970. Microbiological methods. Butterworths, 455-456.

Coque, T. M., Willems, R. J., Fortún, J., Top, J., Diz, S., Loza, E. and Baquero, F. 2005. Population structure of Enterococcus faecium causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(7): 2693-2700.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418): 1318-1322.

Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R. and Baldassarri, L. 2004. Survey for virulence determinants among Enterococcus faecalis isolated from different sources. Journal of Medical Microbiology, 53(1): 13-20.

Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. 1973. Medical microbiology. A guide to the laboratory diagnosis and control of infection. Microbial Infections, 1(1).

Desai, P. J., Pandit, D., Mathur, M. and Gogate, A. 2001. Prevalence, identification and distribution of various species of enterococci isolated from clinical specimens with special reference to urinary tract infection in catheterized patients. Indian Journal of Medical Microbiology, 19(3): 132-137.

Donlan, R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clinical Infectious Diseases, 33(8): 1387-1392.

Duprè, I., Zanetti, S., Schito, A. M., Fadda, G. and Sechi, L. A. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates collected in Sardinia (Italy). Journal of Medical Microbiology, 52(6): 491-498.

Dutka-Malen, S., Evers, S. and Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33(1): 24-27.

Eaton, T. J. and Gasson, M. J. 2001. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology, 67(4): 1628-1635.

Eigner, U., Fahr, A., Weizenegger, M. and Witte, W. 2005. Evaluation of a new molecular system for simultaneous identification of four Enterococcus species and their glycopeptide resistance genotypes. Journal of Clinical Microbiology, 43(6): 2920-2922.

Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. and Huebner, J. 2006. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. Infection and immunity, 74(7): 4164-4171.

Facklam, R. R. 1972. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. Applied Microbiology, 23(6): 1131-1139.

Facklam, R. R. and Collins, M. D. 1989. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. Journal of Clinical Microbiology, 27(4): 731-734.

Facklam, R. R., Carvalho, M. D. G. S. and Teixeira, L. M. 2002. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance, 1-54.

Facklam, R., Bosley, G. S., Rhoden, D., Franklin, A. R., Weaver, N. and Schulman, R. 1985. Comparative evaluation of the API 20S and AutoMicrobic gram-positive identification systems for non-beta-hemolytic streptococci and aerococci. Journal of Clinical Microbiology, 21(4): 535-541.

Farrow, J. A. E. and Collins, M. D. 1984. DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on Streptococcus thermophilus and Streptococcus salivarius. Microbiology, 130(2): 357-362.

Gambarotto, K., Ploy, M. C., Turlure, P., Grélaud, C., Martin, C., Bordessoule, D. and Denis, F. 2000. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. Journal of Clinical Microbiology, 38(2): 620-624.

Grayson, M. L., Grabsch, E. A., Johnson, P. D., Olden, D., Aberline, M., Li, H. Y. and Kerr, P. G. 1999. Outcome of a screening program for vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Victoria. Medical Journal of Australia, 171(3): 133-136.

Gülhan, T., Aksakal, A., Ekin, I. H., SAVAŞAN, S. and Boynukara, B. 2006. Virulence factors of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis strains isolated from

humans and pets. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 30(5): 477-482.

Hagberg, L., Jodal, U., Korhonen, T. K., Lidin-Janson, G., Lindberg, U. and Svanborg Eden, C. 1981. Adhesion, hemagglutination, and virulence of Escherichia coli causing urinary tract infections. Infection and Immunity, 31(2): 564-570.

Hancock, L. E. and Gilmore, M. S. 2002. The capsular polysaccharide of Enterococcus faecalis and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(3): 1574-1579.

Hancock, L. E. and Gilmore, M. S. 2006. Pathogenicity of enterococci. Gram-Positive Pathogens, 299-311.

Hancock, L. E. and Perego, M. 2004. The Enterococcus faecalis fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. Journal of Bacteriology, 186(17): 5629-5639.

Hancock, L. E., Shepard, B. D. and Gilmore, M. S. 2003. Molecular analysis of the Enterococcus faecalis serotype 2 polysaccharide determinant. Journal of Bacteriology, 185(15): 4393-4401.

Hancock, L. and Perego, M. 2002. Two-component signal transduction in Enterococcus faecalis. Journal of Bacteriology, 184(21): 5819-5825.

Hanna, H., Husni, R., Hachem, R. and Raad, I. 2002. Risk factors for vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) infection in colonized patients with cancer. Infection Control & Hospital Epidemiology, 23(2): 102-103.

Hanson, K. L. and Cartwright, C. P. 1999. Comparison of simple and rapid methods for identifying enterococci intrinsically resistant to vancomycin. Journal of Clinical Microbiology, 37(3): 815-817.

Harbarth, S., Cosgrove, S. and Carmeli, Y. 2002. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(6): 1619-1628.

Harrington, S. M., Ross, T. L., Gebo, K. A. and Merz, W. G. 2004. Vancomycin resistance, esp, and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. Journal of Clinical Microbiology, 42(12): 5895-5898.

Hirt, H., Schlievert, P. M. and Dunny, G. M. 2002. In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in Enterococcus faecalis mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. Infection and Immunity, 70(2): 716-723.

Holt, J. G. and Krieg, N. R. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins Company, 787 page, Baltimore.

Hsu, C. T., Ganong, A. L., Reinap, B., Mourelatos, Z., Huebner, J. and Wang, J. Y. 2006. Immunochemical characterization of polysaccharide antigens from six clinical strains of Enterococci. BMC Microbiology, 6: 1-9.

Huebner, J., Quaas, A., Krueger, W. A., Goldmann, D. A. and Pier, G. B. 2000. Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among vancomycin-sensitive and-resistant enterococci. Infection and Immunity, 68(8): 4631-4636.

Huebner, J., Wang, Y., Krueger, W. A., Madoff, L. C., Martirosian, G., Boisot, S. and Pier, G. B. 1999. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of Enterococcus faecalis and vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Infection and Immunity, 67(3): 1213-1219.

Huycke, M. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. S. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerging Infectious Diseases, 4(2): 239.

Huycke, M. M., Spiegel, C. A. and Gilmore, M. S. 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant Enterococcus faecalis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35(8): 1626-1634.

Ike, Y. I., Hashimoto, H. E. and Clewell, D. B. 1987. High incidence of hemolysin production by Enterococcus (Streptococcus) faecalis strains associated with human parenteral infections. Journal of clinical Microbiology, 25(8): 1524-1528.

Ike, Y., Hashimoto, H. and Clewell, D. B. 1984. Hemolysin of Streptococcus faecalis subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. Infection and Immunity, 45(2): 528-530.

Inoue, T., Tomita, H. and Ike, Y. 2006. Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of Enterococcus faecium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(4): 1202-1212.

Iversen, A., Kühn, I., Franklin, A. and Möllby, R. 2002. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. Applied and Environmental Microbiology, 68(6): 2838-2842.

Iwahi, T. I., Abe, O., Nakao, I., Imada, A. and Tsuchiya, J. I. 1983. Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by Escherichia coli in mice. Infection and Immunity, 39(3): 1307-1315.

Iwen, P. C., Rupp, M. E., Schreckenberger, P. C. and Hinrichs, S. H. 1999. Evaluation of the revised MicroScan dried overnight gram-positive identification panel to identify Enterococcus species. Journal of Clinical Microbiology, 37(11): 3756-3758.

Jawetz, E. 1956. Antimicrobial chemotherapy. Annual Review of Microbiology, 10(1): 85-114.

Jett, B. D., Atkuri, R. V. and Gilmore, M. S. 1998. Enterococcus faecalis localization in experimental endophthalmitis: role of plasmid-encoded aggregation substance. Infection and Immunity, 66(2): 843-848.

Jett, B. D., Huycke, M. M. and Gilmore, M. S. 1994. Virulence of enterococci. Clinical Microbiology Reviews, 7(4): 462-478.

Jett, B. D., Jensen, H. G., Nordquist, R. E. and Gilmore, M. S. 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental Enterococcus faecalis endophthalmitis. Infection and Immunity, 60(6): 2445-2452.

Johnston, L. M. and Jaykus, L. A. 2004. Antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from produce. Applied and Environmental Microbiology, 70(5): 3133-3137.

Kalocheretis, P., Baimakou, E., Zerbala, S., Papaparaskevas, J., Makriniotou, I., Tassios, P. T. and Zerva, L. 2004. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54(6): 1031-1034.

Kayaoglu, G. and Ørstavik, D. 2004. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 15(5): 308-320.

Kilpper-Bälz, R. and Schleifer, K. H. 1987. Streptococcus suis sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37(2): 160-162.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. 1992. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott, 146: 171.

Kreft, J. U. and Wimpenny, J. W. 2001. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. Water Science and Technology, 43(6): 135-135.

Kristich, C. J., Li, Y. H., Cvitkovitch, D. G. and Dunny, G. M. 2004. Esp-independent biofilm formation by Enterococcus faecalis. Journal of Bacteriology, 186(1): 154-163.

Kühn, I., Iversen, A., Finn, M., Greko, C., Burman, L. G., Blanch, A. R. and Möllby, R. 2005. Occurrence and relatedness of vancomycin-resistant enterococci in animals, humans, and the environment in different European regions. Applied and Environmental Microbiology, 71(9): 5383-5390.

Leavis, H. L., Willems, R. J., Top, J. and Bonten, M. J. 2006. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in gyrA and parC confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of Enterococcus faecium. Journal of Clinical Microbiology, 44(3): 1059-1064.

Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J. and Willems, R. J. 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity. Journal of Bacteriology, 186(3): 672-682.

Liassine, N., Frei, R., Jan, I. and Auckenthaler, R. 1998. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. Journal of Clinical Microbiology, 36(7): 1853-1858.

Macovei, L. and Zurek, L. 2006. Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. Applied and Environmental Microbiology, 72(6): 4028-4035.

Mah, T. F. C. and O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 9(1): 34-39.

Makinen, P. L. and Makinen, K. K. 1994. The Enterococcus faecalis extracellular metalloendopeptidase (EC 3.4. 24.30; coccolysin) inactivates human endothelin at bonds involving hydrophobic amino acid residues. Biochemical and Biophysical Research Communications, 200(2): 981-985.

Manero, A. and Blanch, A. R. 1999. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Applied and Environmental Microbiology, 65(10): 4425-4430.

Moellering, R. C. 1998. Vancomycin-resistant enterococci. Reviews of Infectious Diseases, 26(5): 1196-1199.

Mohamed, J. A. and Murray, B. E. 2005. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of Enterococcus faecalis isolates. Journal of Clinical Microbiology, 43(10): 5405-5407.

Mundy, L. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews, 13(4): 513-522.

Murray, B. E. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clinical Microbiology Reviews, 3(1): 46-65.

Murray, B. E. 1997. Vancomycin-resistant enterococci. The American Journal of Medicine, 102(3): 284-293.

Naas, T., Fortineau, N., Snanoudj, R., Spicq, C., Durrbach, A. and Nordmann, P. 2005. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus faecium expressing a VanD-like phenotype associated with a vanA genotype. Journal of Clinical Microbiology, 43(8): 3642-3649.

Nallapareddy, S. R., Qin, X., Weinstock, G. M., Höök, M. and Murray, B. E. 2000. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infection and immunity, 68(9): 5218-5224.

Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Sillanpää, J., Garsin, D. A., Höök, M., Erlandsen, S. L. and Murray, B. E. 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of Enterococcus faecalis. The Journal of Clinical Investigation, 116(10): 2799-2807.

Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. and Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of Enterococcus species based on rpoA and pheS genes. Microbiology, 151(7): 2141-2150.

Novais, C., Sousa, J. C., Coque, T. M., Peixe, L. V. and Portuguese Resistance Study Group. 2005. Molecular characterization of glycopeptide-resistant Enterococcus

faecium isolates from Portuguese hospitals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(7): 3073-3079.

Oh, W. S., Ko, K. S., Song, J. H., Lee, M. Y., Park, S., Peck, K. R. and Woo, G. J. 2005. High rate of resistance to quinupristin-dalfopristin in Enterococcus faecium clinical isolates from Korea. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(12): 5176-5178.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 54(1): 49-79.

Pompei, R., Lampis, G., Berlutti, F. and Thaller, M. C. 1991. Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. Journal of Clinical Microbiology, 29(12): 2884-2886.

Prakash, V. P., Rao, S. R. and Parija, S. C. 2005. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. BMC Infectious Diseases, 5: 1-8.

Raad, I. I., Hanna, H. A., Boktour, M., Chaiban, G., Hachem, R. Y., Dvorak, T. and Murray, B. E. 2005. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium: catheter colonization, esp gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49(12): 5046-5050.

Ralovich, B. 1984. Listeriosis research. Present situation and perspective. Akadémiai Kiadó, 84(1): 2-10.

Ramadhan, A. A. and Hegedus, E. 2005. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci. Journal of Clinical Pathology, 58(7): 685-686.

Rice, L. B. 2001. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. Emerging Infectious Diseases, 7(2): 183.

Sandoe, J. A., Witherden, I. R., Cove, J. H., Heritage, J. and Wilcox, M. H. 2003. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. Journal of Medical Microbiology, 52(7): 547-550.

Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R. and Barreto Crespo, M. T. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 41(6): 2569-2576.

Shankar, N., Lockatell, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S. and Johnson, D. E. 2001. Role of Enterococcus faecalis surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infection and Immunity, 69(7): 4366-4372.

Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G. and Gilmore, M. S. 1999. Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. Infection and Immunity, 67(1): 193-200.

Shepard, B. D. and Gilmore, M. S. 2002. Differential expression of virulence-related genes in Enterococcus faecalis in response to biological cues in serum and urine. Infection and Immunity, 70(8): 4344-4352.

Sternberg, C., Christensen, B. B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J. B., Givskov, M. and Molin, S. 1999. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 65(9): 4108-4117.

Tariq, S. and Hadithi, A. 1993. Hydatid disease in western region of Iraq: a review of the case records of Saddam general hospital in Ramadi. Marina Mesopotamica, 6(1): 34-43.

Theilacker, C., Kaczynski, Z., Kropec, A., Fabretti, F., Sange, T., Holst, O. and Huebner, J. 2006. Opsonic antibodies to Enterococcus faecalis strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. Infection and Immunity, 74(10): 5703-5712.

Todd, E. W. 1934. A comparative serological study of Streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on Pneumococcal haemolysin, tetanolysin and Staphylococcus toxin. Journal of Pathology and Bacteriology, 39: 299-321.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M. and Lasa, I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 67(10): 4538-4545.

Toye, B., Shymanski, J., Bobrowska, M., Woods, W. and Ramotar, K. 1998. Clinical and epidemiologic significance of Enterococci intrinsically resistant to vancomycin (Possessing the vanC genotype). Journal of Clinical Microbiology, 36(5): 1469.

Treagan, L. and Pulliam, L. 1982. Susceptibility testing. Medical Microbiology Laboratory Procedures, 233-244.

Tyrrell, G. J., Turnbull, L., Teixeira, L. M., Lefebvre, J., Carvalho, M. D. G. S., Facklam, R. R. and Lovgren, M. 2002. Enterococcus gilvus sp. nov. and Enterococcus pallens sp. nov. isolated from human clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology, 40(4): 1140-1145.

Udo, E. E., Al-Sweih, N., Phillips, O. A. and Chugh, T. D. 2003. Species prevalence and antibacterial resistance of enterococci isolated in Kuwait hospitals. Journal of Medical Microbiology, 52(2): 163-168.

Van Merode, A. E., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. and Krom, B. P. 2006. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by Enterococcus faecalis. Journal of Bacteriology, 188(7): 2421-2426.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P. and Heuck, C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, 3(3): 1-9.

Waar, K., van der Mei, H. C., Harmsen, H. J., Degener, J. E. and Busscher, H. J. 2002. Adhesion to bile drain materials and physicochemical surface properties of Enterococcus faecalis strains grown in the presence of bile. Applied and Environmental Microbiology, 68(8): 3855-3858.

Waters, C. M., Wells, C. L. and Dunny, G. M. 2003. The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. Infection and Immunity, 71(10): 5682-5689.

Watnick, P. and Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. Journal of Bacteriology, 182(10): 2675-2679.

Wells, C. L., Moore, E. A., Hoag, J. A., Hirt, H., Dunny, G. M. and Erlandsen, S. L. 2000. Inducible expression of Enterococcus faecalis aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. Infection and Immunity, 68(12): 7190-7194.

Xiang, L. 2004. Quantitative variation of biofilm among strains in natural population of Candida albicans. Microbiology, 149: 353-362.

Xu, Y., Singh, K. V., Qin, X., Murray, B. E. and Weinstock, G. M. 2000. Analysis of a gene cluster of Enterococcus faecalis involved in polysaccharide biosynthesis. Infection and Immunity, 68(2): 815-823.

Zeng, J., Teng, F. and Murray, B. E. 2005. Gelatinase is important for translocation of Enterococcus faecalis across polarized human enterocyte-like T84 cells. Infection and Immunity, 73(3): 1606-1612.

Zhanel, G. G., Hoban, D. J. and Karlowsky, J. A. 2001. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(1): 324-326.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mustafa Ayad Jasim JASIM

### Eğitim

| | | |
|---|---|---|
| Yüksek Lisans | Çankırı Karatekin Üniversitesi<br>Fen Bilimleri Enstitüsü<br>Biyoloji Anabilim Dalı | 2020-Halen |
| Lisans | Bağdat Üniversitesi<br>Eğitim Fakültesi<br>Biyoloji Bölümü | 2014-2018 |