



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**KLİNİK ENTEROKOK SUŞLARINDA
CRISPR-CAS İMMUN SİSTEMİ VE
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN DAĞILIMI**

DERYA ALBAYRAK

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2019



**KLİNİK ENTEROKOK SUŞLARINDA CRISPR-CAS İMMUN SİSTEMİ VE
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN DAĞILIMI**

Derya ALBAYRAK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2019

Derya ALBAYRAK tarafından hazırlanan “KLİNİK ENTEROKOK SUŞLARINDA CRISPR-CAS İMMUN SİSTEMİ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN DAĞILIMI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/ ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Melahat KURTULUŞ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Ahmet BAŞUSTAOĞLU

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Berrin ÖZÇELİK

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 19/12/2019

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Derya ALBAYRAK

19/12/2019

KLİNİK ENTEROKOK SUŞLARINDA CRISPR-CAS İMMUN SİSTEMİ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN DAĞILIMI

(Yüksek Lisans Tezi)

Derya ALBAYRAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2019

ÖZET

Günümüzde klinik olarak önemli patojen bakterilerin kontrol altına alınabilmesi ve önlenmesi için bakterilerin patojenezi ve stratejileri ile ilgili araştırmaların yapılması çok önemlidir. Enterokokların virulansında, patojenite adaları ve plazmidlerce kodlanan virulans genleri rol oynar. Son çalışmalar, enterokok virülansını, enterokok yüzey proteini (*esp*), hyaluronidaz (*hyl*), seks feromonu (*cob*), serin proteaz (*sprE*), *E. faecalis* regülatörü (*fsrB*), jelatinaz üretimi (*gelE*) ve biyofilm oluşumu gibi virulans faktörleriyle ilişkilendirmiştir. Düzenli aralıklı kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ile ilişkili cas genlerinden oluşan CRISPR sistemi, çeşitli prokaryotik türlerde yaygın olarak bulunur ve yabancı DNA'nın tanınmasını ve yok edilmesini sağlayan bakteriyel bir savunma sistemidir. Bu çalışmada klinik farklı orijinli enterokok izolatlarında virulans faktörleri ve CRISPR-ilişkili (cas) genlerinin dağılımı değerlendirildi. Virülans faktörleri ve CRISPR (CRISPR1-cas, CRISPR2 ve CRISPR3-cas) lokusun dağılımı arasında bir ilişki bulunup bulunmadığı araştırıldı. 130 klinik izolatın 68'inde *esp* geni varlığı görüldü ve en yaygın virulans determinantı olarak *esp* geni tespit edildi (%52,3); *E. faecalis*'de %55,3, *E. faecium* da %47,7 oranında bulundu (p değeri 0,413). *GelE* ve *sprE* en yaygın bulunan ikinci virulans determinantları olarak belirlendi (%50). *GelE*, *E. faecalis* de %75,3, *E. faecium*'da %2,3 (p<0,001); *spr E*, *E. faecalis*'de %74,1 ve *E. faecium*'da %4,5 oranında tespit edildi (p<0,001). İzolatların % 49,2'sinde *cob* (p <0,001), %25,4'ünde *hyl* (p<0,001), %19,2'sinde *fsr B* (p<0,001) gen bölgesi görüldü. *E. faecalis* izolatlarının %9,4'ünde CRISPR1-cas,%56,2'inde CRISPR2, %1,2'inde CRISPR3-cas lokusları tespit edildi. *E. faecium* izolatında ise CRISPR1-cas ve CRISPR3-cas görülmezken,%9,1'inde CRISPR 2 lokusu bulundu. *Cob* varlığı ve CRISPR1-cas bulundurma arasında negatif bir korelasyon tespit edilmesine karşın diğer virülans genleri ile CRISPR sistemleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilmedi.

Bilim Kodu : 1039.5
Anahtar Kelimeler : Enterokok, virülans, CRISPR
Sayfa Adedi : 72
Danışman : Doç. Dr. Melahat KURTULUŞ

THE DISTRIBUTION OF CRISPR-CAS IMMUNE SYSTEM AND VIRULANTIC FACTORS IN CLINICAL ENTEROCOCCINE STRUCTURES

(M. Sc. Thesis)

Derya ALBAYRAK

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

December 2019

ABSTRACT

In recent years, the investigations regarding patogenez and strategies of bacterias have been vitally important in order to control and prevent pathogen bacterias which are clinically significant. In enterococci virulence, pathogenicity islands and virulence genes encoded by plasmids play an active role. Recent studies have been associated enterococcal virulence with virulence factors such as enterococcal surface protein (*esp*), hyaluronidase (*hyl*), sex pheromone (*cob*), serine protease (*sprE*), *E. faecalis* regulator (*fsrB*), gelatinase production (*gelE*), and biofilm formation. The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR associated cas genes is widely found in various prokaryotes and it is a kind of defence system assisting in foreign DNA recognition and its eradication. In this study, the distribution of virulence factors and CRISPR-related (cas) genes in clinically different enterococcus isolates were evaluated. It is surveyed whether there is a significant correlation between virulence factors in clinical enterococci strains and distribution of CRISPR (CRISPR1-cas, CRISPR2 and CRISPR3-cas) locus. According to the results, 68 out of 130 clinical isolates contains *esp* gene and *esp* gene was detected as the most prevalent virulence determinant (52,3%). It was detected in *E. faecalis* 55.3%, in *E. faecium* 47,7% (p 0.413). As the second most prevalent virulence determinant, *gelE* and *sprE* were detected (50%). Specifically, in *E. faecalis* and in *E. faecium*, *GelE* was detected respectively 75,3 % and 2,3 % (p<0,001); *sprE* is detected respectively 74,1 % and 4,5 % (p<0,001). Of all the isolates 49.2% of *cob* (p<0,001), 25,4 % of *hyl* (p<0,001) and 19.2% of *fsrB* (p <0.001) gene were found. CRISPR1-cas loci were detected in 9.4%, CRISPR 2 loci in 56.2%, CRISPR 3-cas loci in 1.2% of *E. faecalis* isolates. There was no CRISPR1-cas and CRISPR 3-cas in *E. faecium* isolates, whereas CRISPR 2 loci were found in 9,1%. Although there was a negative correlation between the presence of *cob* and CRISPR1-cas, no correlation was found between other virulence genes and CRISPR systems.

Science Code : 1039.5

Key Words : Enterococci, virulence, CRISPR

Page Number : 72

Supervisor : Assoc. Prof. Dr.. Melahat KURTULUŞ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Melahat KURTULUŞ'a, yoğun çalışmalarım sırasında gösterdiği sabırdan, araştırma sonuçlarımın istatistiksel analizine verdiği desteklerden ve bu süreçte göstermiş olduğu fedakarlıklardan ötürü eşim Mutlu ALBAYRAK'a, beni yetiştirerek bu günlere getiren ve eğitimim konusunda her türlü özveriye gösteren sevgili ailem, Ahmet GÖKÇE, Leyla GÖKÇE, Umut GÖKÇE ve Dilek YENİEVLİ'ye, çalışmalarım sırasında verdikleri destek için Şeyma ŞARKBÜLBÜLÜ ve Öğretmen Necla Kızılbay Anaolu Lisesi ailesine, örnek toplama aşamasında yardımcı olan Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Labrotubvarından Kenan YÜCE ve Emine ESMER'e ve emeği geçen herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enterekokların Tarihçesi	3
2.2. Enterokokların Sınıflandırılması.....	4
2.3. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri	7
2.4. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	7
2.5. Hücre Duvarı.....	9
2.5.1. Peptidoglikan	10
2.5.2. Teikoik asitler	10
2.5.3. Lipoteikoik asitler	11
2.6. Antibiyotik Direnci	11
2.6.1. β -laktamlar ve Sefalosporinler	12
2.6.2. Aminoglikozitler	13
2.6.3. Linkozamidler ve Streptograminler	13
2.6.4. Trimetoprim-Sulfametoksazol	14
2.6.5. Glikopeptid Direnci	14

Sayfa

2.7. Virölans ve Patojenite	16
2.7.1. Agregasyon maddesi (AS)	16
2.7.2. MSCRAMM Ace	17
2.7.3. Hücre dışı (ekstraselüler) yüzey proteini (Esp)	17
2.7.4. Sitolizin (Cyl).....	17
2.7.5. Hyaluronidazlar	18
2.8. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar	19
2.8.1. Üriner sistem enfeksiyonları	20
2.8.2. Endokardit.....	20
2.8.3. Bakteriyemi.....	20
2.8.4. Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar	20
2.8.5. Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	21
2.8.6. Menenjit	21
2.9. CRISPR-cas Tarihçesi	21
2.10. CRISPR-cas Hakkında Genel Bilgiler	22
2.10.1. CRISPR dizisi	23
2.10.2. Lider sekans	23
2.10.3. Cas genleri	24
2.11. CRISPR-cas Çalışma Prensipleri	24
2.11.1. Adaptasyon	24
2.11.2. Ekspresyon.....	25
2.11.3. İnterferon.....	25
2.12. CRISPR-cas Tipleri	26
2.12.1. Tip I CRISPR-cas sistemi	27

Sayfa

2.12.2. Tip II CRISPR-cas sistemi.....	29
2.12.3. Tip III CRISPR-cas sistemi	30
2.12.4. Tip IV CRISPR-cas sistemleri	31
2.12.5. CRISPR-cas tiplerinin mekanizmalarının karşılaştırılması	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç	35
3.1.1. Tris- borik asit- EDTA (TBE) tamponu.....	36
3.2. Yöntem.....	37
3.2. 1. Enterokok izolatları.....	37
3.2.2. DNA izolasyonu.....	37
3.2.3. Virülans faktörleri polimeraz zincir reaksiyonu	37
3.2.4. CRISPR-cas (CRISPR1-cas, CRISPR2-cas ve CRISPR3-cas) ve PZR	38
3.2.5. Amplifiye ürünlerin agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmesi.....	39
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	72

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enterokokların sınıflandırılması	4
Çizelge 2.2. Enterokok türleri	4
Çizelge 2.3. Enterokokların sınıflandırılması	8
Çizelge 2.4. CRISPR-cas çeşitlerinin karşılaştırılması.....	33
Çizelge 3.1. Virulans faktörlerini kodlayan genlerin PZR belirlenmesi.....	35
Çizelge 3.2. Esp ve hyl multipleks PZR karışımı	37
Çizelge 3.3. Cob, gelE, fsrB, sprE PZR karışımı.....	37
Çizelge 3.4. Virülans faktörleri PZR programı.....	38
Çizelge 3.5. CRISPR-cas lokus PZR karışımı	38
Çizelge 3.6. CRISPR-cas lokus PZR programı	38
Çizelge 3.6. CRISPR-cas lokus PZR programı	38
Çizelge 3.7. Virulans faktörleri ve CRISPR lokus bant büyüklükleri	38
Çizelge 4.1. İzolatların kliniklere göre dağılımı	46
Çizelge 4.2. Klinik materyallere göre virülans faktörlerinin dağılımı.....	48
Çizelge 4.3. CRISPR-cas sistemlerinin klinik materyallere göre dağılımı.....	51
Çizelge 4.4. Enterokok türlerinin klinik materyallere göre virülans genlerini ve CRISPR sistemlerini bulundurma yüzdeleri ve p değerleri.....	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Enterokokların mikroskop görüntüsü	7
Şekil 2.2. Enterokokların koyun kanlı agardaki koloni görüntüsü	8
Şekil 2.3. Enterokokların biyokimyasal testlerle identifikasyonu	9
Şekil 2.4. Enterokoklarda hücre duvar yapısı	10
Şekil 2.5. Bakterilerde peptidoglikan tabakası	10
Şekil 2.6. Gram pozitif bakterilerde teikoik asit	10
Şekil 2.7. Enterokoklarda hücre duvar yapısı	11
Şekil 2.8. Bakteriyel kromozomda bir CRISPR bölgesinin yapısı	24
Şekil 2.9. CRISPR-cas sisteminin çalışma prensibi	26
Şekil 2.10. CRISPR-cas tipleri.....	27
Şekil 2.11. Tiplerine göre CRISPR-cas mekanizmaları	31
Şekil 3.1. <i>esp-hyl</i> agaroz jel görüntüsü.....	41
Şekil 3.2. <i>cob</i> agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.3. <i>gelE</i> agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.4. <i>sprE</i> agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.5. <i>fsrB</i> agaroz jel görüntüsü.....	43
Şekil 3.6. CRISPR1-cas csn 1 agaroz jel görüntüsü	43
Şekil 3.7. CRISPR1-cas korunmuş gen bölgeleri agaroz jel görüntüsü	43
Şekil 3.8. CRISPR2 agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 3.9. CRISPR3-cas csn 1 agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 3.10. CRISPR1-cas korunmuş gen bölgeleri agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 4.1. Enterokok suşlarının tür düzeyinde dağılımı.....	45

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Klinik materyal dağılımı.....	45
Şekil 4.3.Klinik materyale göre enterokok türlerinin dağılımı	48
Şekil 4.4. Klinik mataryellere göre virülans faktörlerinin dağılımı	50
Şekil 4.5. CRISPR-cas sistemlerinin tür düzeyinde dağılımı	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

bç

Baz çifti

kDa

Kilodalton

µg

Mikrogram

µL

Mikrolitre

mL

Mililitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

NAG (GlcNAc)

N-asetil glukozamin

NAM (MurNAc)

N-asetil glukozamin

PBP

Penisilin bağlayan protein

PZR

Polimeraz zincir reaksiyonu

PYRaz

Pirolidonil aminopeptidaz

VRE

Vankomisin rezistant enterokok

VSE

Vankomisin sensitive enterokok

Esp

Enterokok yüzey proteini

Hyl

Hyaluronidaz

DNA

Deoksiribonükleik asit

Gel

Geletinaz

Fsr B

E. faecalis regülatörü

Spr E

Serin proteaz

1. GİRİŞ

Enterokoklar insan ve hayvanların gastrointestinal florasında, toprakta, suda ve çiğ besinlerde doğal olarak bulunan mikroorganizmalardır. Zararsız kommensaller olarak bilinmelerine karşın sonradan kazandıkları virülans genleri ve antibiyotik direnci sebebiyle hastane enfeksiyonlarının en önemli sebeplerinden biri haline gelmiştir. Toplum kaynaklı nazokomiyal enfeksiyonlara neden olmaları ve glikopeptitler dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe direnç göstermeleri nedeniyle son zamanlarda oldukça önemli hale gelmiştir.

Enterokok enfeksiyonlarında sıklıkla karşılaşılan enterokok türleri *E. faecalis* ve *E. faecium*'dur. Bu türlerin patojenitesinde, genomlarında bulunan patojenite adaları ve plazmidlerce taşınan virülans faktörlerinin rol oynadığı bilinmektedir. Enterokokal enfeksiyonların gelişimi, enterokokal yüzey proteini (*esp*), agregasyon maddesi (*agg*), hyaluronidaz (*hyl*), jelatinaz (*gelE*), serin proteaz (*sprE*), *E. faecalis* regülatörü (*fsrB*) ve seks feromonu (*cob*) gibi çeşitli virulans faktörleriyle ilişkilendirilmiştir.

Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ve CRISPR ilişkili (*cas*) gen bölgeleri prokaryotlarda bulunan ve dış kaynaklı genetik elementlere karşı bağışıklık kazandıran bir immün sistemdir. CRISPR-*cas* sistemleri, faj ve plazmid gibi yabancı DNA'lara karşı bakteriyel savunmada önemli rol oynamaktadır. CRISPR-*cas* sistemlerinin plazmit ya da fajların bakteri genomuna girişini engellemesinin yanı sıra yapılan son çalışmalar, bu sistemlerin bakteri için yararlı olabilecek genlerin kazanımını da engellediğini göstermiştir.

Bu çalışma kapsamında Gazi Üniversitesi Merkez Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik enterokok suşlarında *esp*, *hyl*, *gelE*, *sprE*, *fsrB* ve *cob* genlerinin ve CRISPR1-*cas* (CRISPR1-*cas* *csn1* gen bölgesinin varlığı tespit edilerek), CRISPR3-*cas* (CRISPR3-*cas* *csn1* gen bölgesinin varlığı tespit edilerek) ve CRISPR2 lokuslarının dağılımı belirlendi. Enterokoklarda virülans faktörlerinin varlığı ve CRISPR-*cas* sistemi varlığı arasında ilişki olup olmadı değerlendirilecektir. CRISPR-*cas* lokusları ve virülans faktörlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenecektir. Bu çalışmanın, enterokok enfeksiyonlarının daha iyi çözümlenmesine ve buna bağlı olarak da tedavisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Enterokoklar hastane kaynaklı enfeksiyonların sık görülen nedenlerindendir. İnsan ve hayvanların doğal flora elemanı olmasına rağmen son çalışmalar enterokokların önemli nazokomial patojen olduğunu göstermiştir. Kazandıkları antibiyotik direnci sebebiyle son zamanlarda enterokoklar ile ilgili yapılan çalışmalar artmıştır.

2.1. Enterokokların Tarihçesi

İlk olarak 1899 yılında Fransa'da Thiercelin tarafından intestinal kaynaklı Gram (+) koklar 'enterocoque' olarak adlandırılmıştır [1]. 1906 yılında, Andrews ve Horder endokarditli bir hastanın kanından izole ettikleri türü *Streptococcus faecalis* olarak isimlendirmiştir ve 1919 yılında Orla- Jesen tarafından *Streptococcus faecium* tanımlanmıştır [2]. Uzun yıllar D grubu Streptokok olarak sınıflandırılmalarına rağmen DNA-DNA, DNA-Ribozomal RNA hibridizasyon çalışmaları neticesinde 1984 yılında ayrı bir cins olduğu anlaşılmış ve *Enterococcus* olarak isimlendirilmiştir [3].

1970'lerde ve 1980'lerde enterokoklar, önemli nozokomial patojenler olarak tanımlanmıştır. Glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı ilk direnç 1986 yılında İngiltere ve Fransa'da, 1987 yılında ABD'de bildirilmiş ve sonrasında vankomisin ve teikoplanin dirençli suşlar tüm dünyaya yayılmıştır [4].

Ülkemizde VRE suşu ilk olarak 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nde Varol ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [5]. Bunu 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisinden bildirilen suşlar izlemiştir [6]. 2003 yılı itibariyle VRE sorunu ile karşılaşan merkez sayısı onu aşmıştır [7]. VRE suşlarının son yıllardaki gelişimi, gelecekte ülkemiz için önemli sorunlar teşkil edeceğini düşündürmektedir. Bu nedenle direnç mekanizmalarını saptama, tarama yöntemleri ve kontrol önlemlerinin bilinmesi son derece önemlidir.

2.2. Enterokokların Sınıflandırılması

Enterokoklar, Bile Eskülin(BE) besiyerinde üreyebilmeleri, PYR (L-prolidonil- β -naftilamid) ve LAP (Lösin- β -naftilamid) testlerinin pozitif olması, % 6.5 NaCl'de üreyebilmeleri ve 45°C'yi tölere edebilmeleri ile diğer gram pozitif koklardan ayrılırlar [8]. Enterokokların %80'inde tespit edilebilen Grup-D antijeni enterokoklar dışında *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve bazı *Vagococcus*' larda da olduğu için bu antijenin taksonomi için yetersiz olduğu görülmüştür [9].

Çizelge 2.1. Enterokokların sınıflandırılması

Kingdom	Bacteria
Division	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Lactobacillales
Family	Enterococcaceae
Genus	Enterococcus

Günümüze kadar bu genusta 56 tür, 2 alt tür tanımlanmıştır:

Çizelge 2.2. Enterokok türleri

No	Yıl	Referans	Tür
1	1984	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
2	2005	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus aquimarinus</i>
3	1998	De Vaux ve ark [12]	<i>Enterococcus asini</i>
4	1984	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus avium</i>
5	2015	Kadri ve ark [13]	<i>Enterococcus bulliens</i>
6	2006	Carvalho ve ark [14]	<i>Enterococcus caccae</i>
7	2007	Sukontasing ve ark [15]	<i>Enterococcus camelliae</i>
8	2005	Naser ve ark [16]	<i>Enterococcus canintestini</i>
9	2003	De Graef ve ark [17]	<i>Enterococcus canis</i>
10	1984	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
11	1983	Devriese ve ark [18]	<i>Enterococcus cecorum</i>

Çizelge 2.2.(devam) Enterokok türleri

12	1990	Devriese ve ark [18]	<i>Enterococcus columbae</i>
13	2005	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus devriesei</i>
14	2013	Kim ve ark [19]	<i>Enterococcus diestrammenae</i>
15	1991	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus dispar</i>
16	1984	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus durans</i>
17	2013	Cotta ve ark [20]	<i>Enterococcus eurekensis</i>
18	1984	Schleifer ve Kilpper-Balz [21]	<i>Enterococcus faecalis</i>
19	1984	Schleifer ve Kilpper-Balz [21]	<i>Enterococcus faecium</i>
20	1992	Pompei ve ark [22]	<i>Enterococcus flavescens</i>
21	1984	1984 Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus gallinarum</i>
22	2002	Tyrrell ve ark [23]	<i>Enterococcus gilvus</i>
23	2001	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>
24	2004	Koort ve ark	<i>Enterococcus hermannienseis</i>
25	1985	Farrow ve Collins	<i>Enterococcus hirae</i>
26	2004	Fortina ve ark	<i>Enterococcus italicus</i>
27	2012	Morandi ve ark	<i>Enterococcus lactis</i>
28	2013	Cotta ve ark [20]	<i>Enterococcus lemanii</i>
29	1984	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus malodoratus</i>
30	2001	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus moravienseis</i>
31	1986	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus mundtii</i>
32	2014	Lucena-Padrós ve ark	<i>Enterococcus olivae</i>
33	2002	Tyrrell ve ark [23]	<i>Enterococcus pallens</i>
34	2003	Law-Brown ve Meyers [24]	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>
35	2012	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus plantarum</i>
36	2001	Teixeira ve ark [26]	<i>Enterococcus porcinus</i>
37	1989	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus pseudoavium</i>
38	2012	Sistek ve ark [25]	<i>Enterococcus quebecensis</i>
39	1989	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus raffinosus</i>
40	2001	Teixeira ve ark [26]	<i>Enterococcus ratti</i>
41	2012	Niemi ve ark [27]	<i>Enterococcus rivorum</i>
42	2013]	Sedláček ve ark [28]	<i>Enterococcus rotai</i>

Çizelge 2.2.(devam) Enterokok türleri

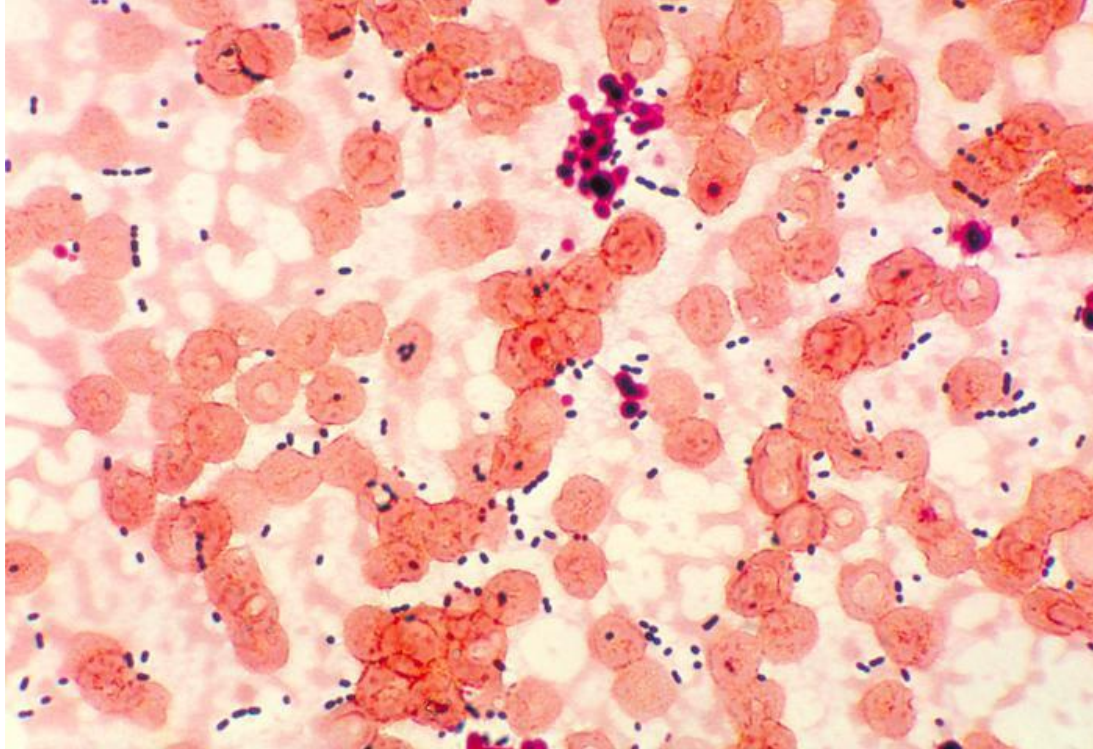
43	1991	Rodrigues ve Collins [29]	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>
44	2013	Chen ve ark [30]	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> <i>subsp. saccharolyticus</i>
45	2013	Chen ve ark [30]	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> <i>subsp. taiwanensis</i>
46	2004	Vancanneyt ve ark [31]	<i>Enterococcus saccharominimus</i>
47	2016	Harada ve ark [32]	<i>Enterococcus saigonensis</i>
48	1991	Kusuda ve ark [33]	<i>Enterococcus seriolicida</i>
49	2006	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus silesiacus</i>
50	1989	Collins ve ark [10]	<i>Enterococcus solitarius</i>
51	1991	Martinez-Murcia ve Collins	<i>Enterococcus sulfureus</i>
52	2006	Švec ve ark [11]	<i>Enterococcus termitis</i>
53	2008	Tanasupawat ve ark	<i>Enterococcus thailandicus</i>
54	2012	Sistek ve ark [25]	<i>Enterococcus ureasiticus</i>
55	2013	Sedláček ve ark [34]	<i>Enterococcus ureilyticus</i>
56	2011	Rahkila ve ark [35]	<i>Enterococcus viikkiensis</i>
57	2001	Vancanneyt ve ark [31]	<i>Enterococcus villorum</i>
58	2014	Li ve ark [36]	<i>Enterococcus xiangfangensis</i>

2.3. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterokoklar tek tek yada kısa zincirler halinde bulunan, Gram (+), fakültatif anaerob, birkaç istisna dışında hareketsiz koklardır [37]. Spor oluşturmazlar ve homofermantatiftirler [38]. Katalaz negatif özellikte olmalarına rağmen pseudokatalaz aktivite gösteren suşları da vardır. 10°C-45°C'de üreyebilmekte ve alfa, beta, gama hemoliz yapabilmektedirler. pH 9,6'da, % 6,5 NaCl çözeltisinde büyüebilme ve 60°C'de yarım saat hayatta kalabilme yeteneğindedirler [39-40]. Enterokoklara ait tüm suşlar lösinaminopeptidaz (LAP) üretebilmektedir. Geniş bir pH aralığında üreyebilmektedirler. Sodyum azid, safra tuzu ve sodyum klorüre dayanıklıdır. Tüm türleri %40 safra tuzu ve %3 NaCl içeren besiyerinde gelişebilirken *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* %6,5 NaCl içeren besiyerinde pH 9,6'da üreyebilirler [37, 41, 26].

2.4. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Enterokoklar tekli, ikili yada kısa zincirler halinde üreyen koklardır. Morfolojik olarak stafilokoklara çok fazla benzedikleri için mikroskopta stafilokoklardan ayırt edilemezler.



Şekil 2.1. Enterokokların mikroskop görüntüsü [37]

Koyun kanlı agarında kabarık gri-beyaz renkte koloniler oluştururlar. Sıvı besiyerlerinde ise bulanıklık oluşturmazlar, dipte çökelti oluşturarak ürerler.



Şekil 2.2. Enterokokların koyun kanlı agardaki koloni görüntüsü

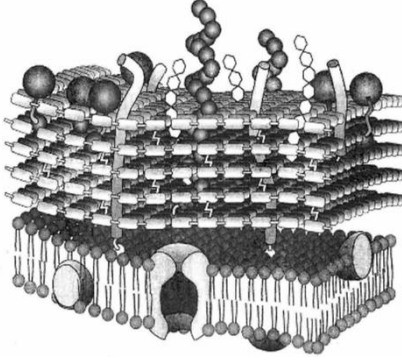
Enterokoklar, pirüvat kullanabilmeleri, arjinini hidrolize edebilmeleri, karbonhidratlı besiyerlerinde asit üretmeleri, % 0.04 tellüriti tolere edebilmeleri, metil- α -D-glikopiranozid (MGP)'den asit üretmeleri ve hareket edip edememelerine göre biyokimyasal olarak birbirlerinden ayrılırlar.

Çizelge 2.3. Enterokokların sınıflandırılması

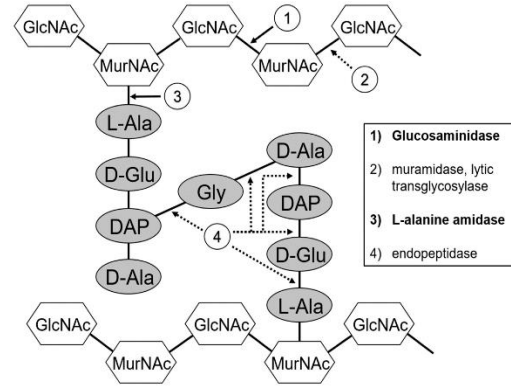
Enterokok türü	MAN	SOR	ARA	RAF	TEL	ARG	PYU	MGP	Motilite
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>E. faecium</i>	+	-	+	V	-	+	-	-	-
<i>E. durans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. avium</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	+	-	-	V	+	+
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-

MAN: mannitol, SOR: sorboz, ARA: arabinoz, RAF: rafinoz, TEL: tellürit, ARG: arjinin, PYU: pürivat, MPG: metil α -D-glukopiranozid, +: olumlu test sonucu, -: olumsuz test sonucu, V: değişken test sonucu

duvarı ağırlığının% 10'undan azını içerir.



Şekil 2.4. Enterokoklarda hücre duvar yapısı [43]



Şekil 2.5. Peptidoglikan tabaka

2.5.1. Peptidoglikan

Enterokokal hücre duvarının temel bileşeni peptidoglikandır [43]. Peptidoglikan tabakası 30-200 katmandan meydana gelebilir ve hücre duvarına sağlamlık ve direnç sağlar [44]. Peptidoglikan, N-asetilmuramik asit - (β 1-4) ve N-asetilglukozamin (MurNAC-GlcNAC) olmak üzere şeker türevlerinden ve az sayıda özgül aminoasitlerden oluşur. L-alanin ,D-alanin ,D-glutamik asit ve lizin, gram pozitiflerin peptidoglikan tabakasında bulunan özgül aminoasitlerdir.

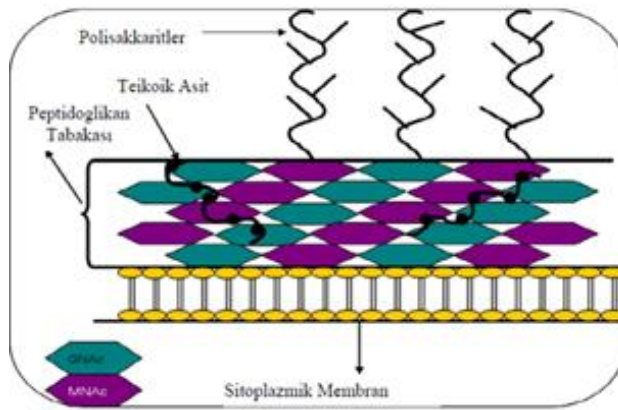
Peptidoglikan tabakası N-asetil glikozamin (GNAC) ve N-asetil muramik asit (MNAc) moleküllerinin glikan zincirler ve L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Alanin kısa peptid bağlar ile birbirine bağlanması ile oluşur. Komşu peptidler, pentapeptid ile çapraz bağlanır [44].

2.5.2. Teikoik asitler

Teikoik asit zincirleri, hücre membranı yada duvarı ile bağlantılıdır ve gliserol yada ribitolfosfat polimerlerinden oluşur. Sitoplazmik membran glikolipitlerinden dışarıya doğru uzanır. Bu yapıların virulansta rol oynadığı ve bakteriye antijenik özellik kazandırdığı bilinmektedir [42]. Teikoik asitler, memeli fibronektinine yapışmayı sağlarlar ve bakteriyofaj reseptörüdürler.

2.5.3. Lipoteikoik asitler

Lipoteikoik asitler sitoplazmik membrana gömülü haldedir ve peptidoglikanın iç kısmından hücre yüzeyine tutunur. LTA, BgsA ve BgsB enzimleriyle lipit zarına tutturulur. LTA glikozilasyonunun doğası enterokoklara özgü olduğundan, bu modifikasyondan sorumlu enzimler henüz tanımlanmamıştır.



Şekil 2.7. Enterokoklarda hücre duvar yapısı [44].

2.6. Antibiyotik Direnci

Enterokoklarda antibiyotik direnci, doğal (intrasink) direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere ikiye ayrılır. Enterokoklarda doğal direnç ile ilgili genler kromozomlar üzerinde bulunurken, kazanılmış direnç plazmit ve transpozonlar tarafından aktarılır.

Doğal antibiyotik direnci, antibiyotik kemoterapiyi önleyen ve tüm bakteri türlerinde bulunan bir olgudur [45]. İntrasink direnç olarak da adlandırılan doğal direnç enterokokların kromozomunda doğal olarak bulunan genler tarafından sağlanan yapısal bir dirençtir. Enterokoklar sefalosporinlere, penisilinlere, linkozamidlere, aminoglikozidlere düşük düzeyde doğal olarak dirençlidir [41].

Bakterilerin antibiyotiklere karşı koymak için farklı stratejiler kullandıkları bilinmektedir. Antibiyotiğe hiç afinite göstermeyen veya zayıf afinite gösteren hedef proteini kodlayan gendeki rastgele mutasyonla veya başka bakterilerden antibiyotik direnç genlerinin yatay transferiyle direnç kazanabilirler. Bu dirence kazanılmış direnç yada ekstrinsik direnç denir.

Antibiyotiğe dirençli genler, antibiyotiği enzimatik olarak parçalayabilir, antibiyotik hedef bölgesini değiştirebilir veya gelen antibiyotiği bir taşıma mekanizması ile hücreden dışarı pompalayabilir. Enterokoklarda bulunan antibiyotik direnci şu şekilde sınıflandırılabilir [8]:

- a) Beta-laktam antibiyotik direnci
- b) Aminoglikozit direnci
- c) Linkozamid direnci
- d) Trimetoprim-sülfametoksazol direnci
- e) Glikopeptid direnci
- f) Kinupristin/dalfopristin direnci

2.6.1. β -laktamlar ve Sefalosporinler

Bakterilerin çoğunun büyümesi, pentapeptid öncü moleküllerinin bir peptidoglikan hücre duvarına enzimatik bağlanmasına bağlıdır. Bu çapraz bağlama reaksiyonlarından sorumlu olan enzimlere penisilin bağlama proteinleri (PBP'ler) denir. β -laktamlar (pentapeptid öncüllerinin yapısal analogları) bu proteinlere kovalent olarak bağlanarak normal hücre duvarı büyümesini bozarlar. β -laktam ajanlarının PBP'lere bağlanması, bozulmuş hücre duvarı sentezi nedeniyle programlanmış hücre ölümü ile sonuçlanır [46]

Enterokoklar, β -laktam antibiyotiklere zayıf şekilde bağlanan düşük frekanslı PBP'leri (*E. faecium*'da PBP5, *E. faecalis*'te PBP4) açığa çıkarır. Penisilinler için minimum inhibisyon konsantrasyonlar (MİK) tipik olarak *E. faecalis* için 2-8 mg/ml ve *E. faecium* için 8-16 mg/ml'dir ve bunlar kromozomal olarak kodlanmış düşük afiniteli PBP genlerini içermezler [1].

Mutasyona uğramamış düşük etkili PBP'lerin aşırı üretimi, enterokokların penisilinlere karşı düşük seviyeli direnci göstermesini sağlar [1].

Enterokoklarda betalaktamaz üretimi beta laktam antibiyotiklerine karşı geliştirilen dirençte ikinci bir yöntemdir. Beta laktamazı kodlayan gen geletinazı da taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmaktadır ve bu plazmid yatay gen transferi ile enterokoklara aktarılmaktadır. Bu mekanizmada beta laktamazlar penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri parçalayarak inhibe eder. Bu sayede antibiyotik etkisiz hale getirilir. Fakat bu mekanizma

sefalosporinleri, imipenemi ve penisilinaz dirençli penisilinleri, etkilemez [41].

2.6.2. Aminoglikozitler

Hem *E. faecium* hem de *E. faecalis*, klinik olarak elde edilebilir aminoglikozit konsantrasyonlarına karşı doğal olarak dirençlidir. *E. faecalis*'te, MİK (minimum inhibisyon katsayısı)'ler, aminoglikozitler için değişkenlik gösterir. *E. faecalis*'teki doğal direnç, aminoglikozitin hücreye girememesi durumudur. Enterokoklar aminoglikozitlere, ribozomal bağlanma bölgesini değiştirerek, aminoglikozit transportunu değiştirerek yada aminoglikozit modifiye edici enzim üreterek direnç geliştirirler. Bu mekanizmalardan en sık gözlemlenen enzim üreterek direnç oluşturmaktadır. Bu enzimler enterokoklarda kromozomal olarak kodlanmıştır, hücrenin sitoplazmasında bulunur ve sitoplazmaya geçen aminoglikozitleri inaktive eder [8].

E. faecium'da bulunan kromozomal olarak kodlanan asetiltransferaz enzimi, tobramisine ve 1000 mg / ml'ye kadar kanamisine direnç gösterir. Ek olarak, *E. faecium*'da *efmM* geni ile kodlanmış, m5 C metiltransferaz enzimi, dibekasin, tobramisin ve kanamisine karşı düşük seviyede direnç sağlar [47].

Enterokoklarda ne gentamisin ne de streptomisine karşı instrink enzim aracılı yüksek seviye direnç tanımlanmıştır. Bu nedenle, bu ilaçlar enterokoklardaki sinerjistik aktiviteyi korur ve sonuç olarak *E. faecium* veya *E. faecalis*'in neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda tedavi için tercih edilen ilaçlar olarak ortaya çıkmıştır [48].

2.6.3. Linkozamidler ve Streptograminler

E. faecalis, klindamisin (bir lincosamid), kinupristin (streptogramin B sınıfı) ve dalfopristin'e (streptogramin A sınıfı) dirençlidir. Bu direnç *lsa* geninin ekspresyonu ile sağlanır. Genel olarak, kinupristin-dalfopristine karşı klinik direnç oluşması için, bakterilerin hem streptogramin A hem de streptogramin B'ye dirençli olması gerekir. *E. faecium*, içsel *msrC* geni tarafından kodlanan bir ABC-akış pompası içerir. Stafilokoklarda *msrA* ve *msrB*'nin yakın bir akrabası olan bu gen, *E. faecium*'a streptograminA direncini veren ayrı bir belirleyici edindiğinde, streptogramin B bileşiklerine düşük seviyeli direnç (MİK 1-2 mg / ml) verir [45].

2.6.4. Trimetoprim-sulfametoksazol

Çoğu bakteri, folatı ortamdan emme kabiliyetinden yoksundur ve nükleik asitlerin üretilmesi için de novo folat sentezi gereklidir. Trimetoprim-sülfametoksazol folat sentezini inhibe eder ve geniş bir bakteri spektrumunu sinerjik olarak inhibe eder. Enterokoklar, diğer bakterilerden farklı olarak trimetoprim sülfametoksazolün etkilerinden kurtulabilir ve folik asidi çevreden emebilirler [50].

2.6.5. Glikopeptid direnci

Vankomisin, pentapeptid öncüsünün D-ala-D-ala terminaline bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder. Glikopeptide dirençli organizmalar, D-ala terminalini D-ala-D-ala-laktat veya D-ala-D-ala-serin ile değiştirir. Bu modifiye edilmiş hücre duvarı öncüleri, normal öncüllere göre 1,000 kat daha düşük afinite ile glikopeptidleri bağlar [51].

Ligaz enziminin varlığına göre enterokoklarda glikopeptid direncini oluşturan 6 farklı direnç tanımlanmıştır. Bu dirençler Van A, Van B, Van C, Van D, Van E, Van G olarak adlandırılmaktadır. Bu direnci oluşturan gen bölgeleri plazmiter ve plazmitlere entegre halde olan transpozonlar üzerinde kodlanmaktadır. VanA, VanB ve VanD tipi dirençler D-ala'yı D-ala-D-ala-laktat, VanC ve VanE tipi direnç ise D-ala-D-ala-serin ile değiştirir [52].

Van A tipi direnç

İlk olarak *E. faecium* da tespit edilmiş olasa da daha sonra diğer enterokok türlerinde de gözlemlenmiştir. Van A geni tarafından kodlanır. Vankomisine ve teikoplanine yüksek seviyede direnç sağlar. Bu gen Tn1546 transpozonu ile sonradan kazanılmıştır. Van A tipi direncin oluşabilmesi için 7 farklı enzim gereklidir. Bu enzimler Van A, H, X, Y, Z, R ve S'dir.

Başlangıçta, hücresel piruvat, VanH dehidrogenaz tarafından d-laktata dönüştürülür. VanA ligazı daha sonra D-ala'yı D-laktat'a bağlar. Konak enzimler, düşük afiniteli pentapeptit öncüsünü veren D-ala-D-laktat'ı tripeptit öncülüne bağlar.

Glikopeptitlere karşı tam direnç sağlanabilmesi için, sadece değiştirilmiş öncülün yapımı

yeterli değildir, aynı zamanda normal öncüllerin ortadan kaldırılması gerekir. VanX, D-ala-D-ala'yı hidroliz eder. VanY, terminal D-ala'yı hidroliz eder ve normal hücre duvarı yapımı için işe yaramaz hale getirir. VanZ'nin direncini artırdığı mekanizma bilinmemektedir, ancak mevcut olduğunda teikoplanin duyarlılığını azaltmaktadır [53].

Van B tipi direnç

Van A tipi direnç tüm enterokok türlerinde görülebilirken Van B tipi direnç sadece *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde görülür. Tn1546 ve Tn5382 transpozonlarının konjugasyonla aktarılması yoluyla oluşur. VanB operonunda ek açık okuma çerçeveleri VanW ve VanV tanımlanmıştır; onların işlevleri de henüz bilinmemektedir. Bu tip dirençte vankomisine orta seviyede direnç gösterirken teikoplanine duyarlılık gösterir [45].

Van C tipi direnç

Van C tipi direnç, vankomisine orta seviyede direnç gösterirken, teikoplanine duyarlıdır. Yapısal kromozomda doğal olarak kodlanır bu nedenle yatay gen transferleriyle başka suşlara aktarılamaz. *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* ve *E. flavescens* 'de görülür [54].

Van D, Van E, Van G tipi direnç

Bu direnç tipleri enterokoklarda nadir olarak görülür. Van D genleri bakteriyel kromozom üzerinde kodlanmaktadır [5].

2.7. Virölans ve Patojenite

Bir mikroorganizmanın patojenitesine, yani hastalık yapabilme yeteneğine virölans denir. Bir organizmanın virölansının, patojenik adalar [PAI] olarak adlandırılan özel bölgelerde bulunan virölans kodlayan genler düzenlemektedir.

Virölansı en yüksek olan enterococcus türleri tıbbi izolatlardır, bunu gıda izolatları ve ardından başlangıç suşları izler. Enterococcus'un PAI'sı ilk olarak 1980'lerde nozokomiyal enfeksiyon salgını yaratan ve bir çok ilaca dirençli *E. faecalis*'in [MMH594] genomunda tanımlanmıştır. Enterococcus türlerinde bir sürü virölans belirlenmiştir, örneğin gastrointestinal sistemde kolonileşebilme kabiliyeti; trombospondin, laktoferrin ve vitronektin dahil olmak üzere bir dizi hücre dışı matris proteinine yapışma yeteneği; ve idrar yolu epiteli, ağız boşluğu epiteli ve insan embriyosu böbrek hücrelerine yapışma yeteneği bunlara örnektir. Yaygın olarak bilinen virölans faktörleri agregasyon maddesi (AS), MSCRAMM Ace (Enterococci'den gelen kollajenin yapışkan matriks molekülü yapışkanlığını tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni),serin proteaz, hücre dışı yüzey proteini (esp), jeletinaz, sitolizin,hyaluronidazdır [55].

2.7.1. Agregasyon maddesi (AS)

Bakteriyel konjugasyon sırasında çiftleşmeyi destekleyen, *E. faecalis*'in feromon ile uyarılabilen bir yüzey proteinidir. *E. faecalis*'in yüzeyindeki agregasyon maddesinin (AS), büyük kümeler oluşturduğu *in vivo* olarak gösterilmiştir ve bu nedenle patogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Agregasyon Maddesi (AS), plazmid transferini kolaylaştırmak için verimli enterokokal verici-alıcı temasına aracılık eder. AS'nin varlığı, enterokok hücre yüzeyinin hidrofobikliğini artırır. Bu, kolesterolün fagozomlara lokalizasyonunu indükler ve lizozomal veziküllerle füzyonu geciktirdiği veya önlediği düşünülmektedir. AS, bir feromon ile indüklenebilen bir yüzey glikoproteinidir ve konjugasyon sırasında küme oluşumuna aracılık eder, böylece plazmid transferinde yardımcı olduğu gibi bir ökaryotik yüzey dizisine yapışmaya da yardımcı olur. Yapılan çalışmalarda *E. faecalis*'in klinik izolatlarının pulsed – field elektroforezi analizi, AS'yi kodlayan genin *E. faecium* izolatlarında bulunmadığını göstermiştir [9,53].

2.7.2. MSCRAMM Ace

E. faecalis'te bulunan başka bir hücre yüzeyi proteini Ace'dir. Bu, yapışkan matriks molekülleri (MSCRAMM) ailesini tanıyan, mikrobiyal yüzey bileşenlerine ait olan bir kolajen bağlayıcı proteindir. Ace geninin, endokardit patogeneğinde % 90 oranında rol oynamaktadır [9].

2.7.3. Hücre dışı (ekstraselüler) yüzey proteini (*esp*)

Hücre dışı yüzey proteini (*esp*), ilk olarak Shankar ve arkadaşları tarafından *Enterococcus* türlerinde tarif edilen, hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir [56]. *Esp* geni 5622 bp'den oluşur ve enfeksiyon kaynaklı izolatlarda yüksek frekansta bulunur. Adezyon, kolonizasyon, immün sistemden kaçma ve antibiyotik direncinde rol oynadığı düşünülmektedir. *Esp* aynı zamanda çevresel strese karşı direnç ve idrar yolu gibi ökaryotik hücrelere yapışmayı sağlayan enterokokal biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. Çalışmalar, *esp* geninin bozulmasının, *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma yeteneğini bozduğunu göstermiştir. Sütten izole edilen enterokok izolatlarında *esp* gen bölgesinin varlığı *esp* geninin patajonite ile alakalı olmadığını düşündürmektedir. *Espfm* genini taşıyan *E. faecium* suşları, bu gene sahip olmayan suşlardan daha yüksek konjugasyon oranlarına sahiptir. Ayrıca ampisilin, siprofloksasin ve imipenem için daha yüksek direnç gösterirler [9].

Enterokokların biyofilm üretme yeteneği, endodontik ve idrar yolu enfeksiyonlarının yanı sıra endokardit oluşumunda temeldir. Enterokoklarla pili oluşumu biyofilm oluşumu için gereklidir, bununla ilişkili gen kümesi *ebp*'dir (endokardit ve biyofilm ile ilişkili pili). *Ebp* operon *ebpA*, *ebpB* *ebpC* ve bir *srtC* (sortaz C kodlayan) geninden oluşur. Pili oluşturmamayan mutant bir enterokokun biyofilm de oluşturmadağı görülmüştür [9].

2.7.4. Sitolizin (Cyl)

En iyi araştırılmış virülans faktörlerinden biri de sitolizindir [57]. *Enterococcus* türlerinin patogeneğinde etkili olan sitolizin, diğer bakterilerin, eritrositlerin ve diğer ökaryotik hücrelerin zarlarını tahrip edebilen bir toksindir. Sitolizin (ayrıca hemolizin olarak da bilinir), genleri feromona cevap veren plazmitlerde bulunur ve. insan, at ve tavşan eritrositlerini parçalayabilen sitolitik bir proteindir [58]. Sitolisin insanlarda b-hemolitik

özelliklere sahiptir ve diğer Gram pozitif bakterilere karşı öldürücüdür. *cyLLs* gen grubu, sitolisin operonlarının düzenleyici olmayan genleridir ve bu genlerin klinik izolatlardaki insidansları yüksektir. Sitolisin, iki bileşenli bir sistemi içeren bir çekirdek algılama mekanizması tarafından düzenlenir [9,59,60].

2.7.5. Hyaluronidazlar

Hyaluronidazlar, jelatinaz ve serin proteaz içeren bir grup hidrolitik enzim, *Enterococcus* türlerinin virülansında rol oynamaktadır. Ancak kesin rolleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Hyaluronidaz, hyaluronik asit üzerinde etkilidir ve doku hasarına bağlı bozucu bir enzimdir. Hyaluronidaz, bağ dokusunun mukopolisakkarit kısmını depolimerize eder, böylece enterokokların ve ayrıca toksinlerinin konak doku yoluyla yayılmasını kolaylaştırır. Hyaluronidaz, kromozomal *hyl* geni tarafından kodlanır [61].

Enterokok patogeneğinde hem jelatinaz hem de serin proteazın, biyofilm oluşumunda bir işlevi olmasına rağmen, ana rolünün, konak dokuları parçalayarak bakterilere besin sağlamak olduğu düşünülmektedir.

Jelatinaz (*GelE*), *E. faecalis* tarafından salgılanan, hücre dışı bir çinko metalo-endopeptidazdır. Jelatini, kazeini, hemoglobini ve diğer biyoaktif peptidleri hidrolize edebilir. Fibrinojenin enzimatik hidrolizi sonucunda, enterositlerin bozulması nedeniyle bakteriyel konakçı dokuya göç mümkün olabilir [57] *Geletinazı* kodlayan gen (*gelE*), bakteriyel kromozomun üzerinde bulunur ve hücre yoğunluğuna bağlı bir şekilde düzenlenir [9]. *Gel E* çoğunlukla *sprE* geni ile birlikte operon oluşturur [57].

sprE geni serin proteazı kodlar ve *gel E* ile birlikte transkrip edilir. *GelE* ve *sprE*'nin transkripsiyonu, *fsr* (fokal streptokok regülatörü) operonu tarafından kodlanan çekirdek algılama sistemi tarafından büyüme fazına bağlı bir şekilde düzenlenir [9].

Çekirdek algılaması, bir bakteri popülasyonunun, indükleyici peptid (AIP) aracılığıyla sinyal ürettiğinde meydana gelir. AIP daha sonra, iletişim sinyalinin artan ifadesi veya sinyali üreten hücrelerin sayısının artmasıyla ortamda birikir. Bu mekanizma iki bileşenli bir sistem tarafından düzenlenir.

Fsr operonu *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC* genlerini içerir. *FsrA* geni, monosistronik olarak bir yanıt regülatörüne kopyalanır ve sırasıyla bir işlem enzimini ve bir sensör kinazı kodlayan *fsrB* ve *fsrC* ile birlikte kopyalanır. *FsrB*, feromon (GBAP) peptidini aktive eden jelatinaz biyosentezini serbest bırakır ve GBAP birikimi ile durağan faza geçiş meydana gelir ve *gel* ve *sprE* indüklenir.

E. faecalis'te *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC*'de mutasyonlar mevcut olduğunda, biyofilm oluşumunda% 28-32 oranında bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar endokardite sebep olan *E. faecalis* suşlarında *fsr* operonu bulunduğunu göstermiştir. Bu da virülans ve hastalığın oluşumunda *fsr*'nin önemli olduğunu düşündürmektedir [9, 45].

Enterokoklar seks feromonlarını kromozomal olarak kodlayan genlerin üretimine bağlı plazmid birikimi mekanizmasına sahiptir. - *ccf*, *cob*, *ccf* ve *cpd* genleri seks feromon elementlerini kodlar [62]. Feromonlar hücreler arasında plazmidlerin konjugatif transferini kolaylaştıran 7-8 amino asitten oluşan küçük peptitlerdir [63]. Alıcı hücreler tarafından salgılanan feromonlar donöre özgüdür ve plazmidinin konjugatif operonlarının ekspresyonunu indükler. Bir suş genellikle birkaç farklı feromon salgılar. Feromonlarının yanı sıra, her bir feromona-bağımlı plazmid, feromona uygun, rekabet edebilen inhibitör gibi davranan peptitlerin salgılanmasını sağlar. Feromonlar donör hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlandığında, agregasyon maddesinin (AS) genini indükler [64-65]. *Asa1* geninin ekspresyonu, etkili plazmid transferini mümkün kılan hücre agregatlarının oluşumuna yol açar [62]. Ancak feromonların tek rolü bu değildir; ayrıca insan nötrofillerini kimyasal olarak çekebilir ve süperoksitlerin (mutajenik maddeler) üretimini indükleyebilir ve enflamatuvar koşulları başlatabilir [66].

2.8. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Son zamanlarda enterokokların sebep olduğu hastalıklar oldukça artmıştır. İnsanlarda fekal örneklerin neredeyse tamamında enterokoklar izole edilebilmektedir. Bununla birlikte son çalışmalarda izole edilen örneklerde *E. faecalis* türlerine daha sık rastlanmaktadır [1]. Özellikle enterokoklar hastane enfeksiyonunun başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. Üriner sistem enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi, karın içi pelvik enfeksiyonları, yara ve yumuşak doku enfeksiyonları, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, neonatal enfeksiyonlar, yenidoğan sepsisi ve menenjit enterokokların sebep olduğu başlıca enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlar arasında en sık karşılaşılan üriner sistem

enfeksiyonlarıdır.

2.8.1. Üriner sistem enfeksiyonları

Özellikle idrar yollarının veya kalıcı kateterlerin yapısal anormallikleri bulunan hastalarda, mesane, prostat ve böbrek, enterokoklar tarafından yaygın olarak enfekte edilir. Genellikle hastane enfeksiyonlarına yol açarlar [67]. Enfeksiyon muhtemelen üretra ve üreterlere yükselen organizmalardan kaynaklanmaktadır [45]. Enterokokların en sık neden olduğu enfeksiyonlardır ve enfeksiyonların çoğu nozokomiyaldir [37]. Yoğun bakım ünitelerinde görülen idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %15'ine enterokoklar yol açmaktadır.

2.8.2. Endokardit

Staphylococcus aureus ile *Staphylococcus viridans*'dan sonra endokarditte sebep olan üçüncü etken enterokoklardır. Bakteriyel endokarditin % 5- 15'ini enterokoklar oluşturur. Genellikle etken *E. faecalis*'dir. 50 yaş üzeri kişilerde daha sık rastlanır [67]. Hastalık cerrahi yolla ya da manüpülasyonlarla gastrointestinal sistemden veya çoğunlukla da genitoüriner enfeksiyon ve genitoüriner bölgeye tıbbi girişim uygulanmasından kaynaklanır [55].

2.8.3. Bakteriyemi

Birçok vaka polimikrobiyal olup, intravenöz hat, apse ve idrar yolu enfeksiyonu gibi tanımlanabilir kaynaklardan oluşurken, büyük bir oranda belirsiz kalır ve muhtemelen bağırsaklardan kaynaklanır. Bu enfeksiyonlarda en büyük problem, bu hastalığa eşlik eden endokardit bulunmasıdır. Bakteriyemilerde *E. faecium*'un görülme sıklığı, *E. faecalis*'ten çok daha yüksektir [67].

2.8.4. Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokok doğal flora elemanı olmaları sebebiyle, karın içi ve pelvik yara enfeksiyonlarında en çok izole edilen ikinci türdür [5]. Ancak bu enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyaldir ve bu nedenle, bu tür durumlarda enterokokların rollerini değerlendirmek zordur [38].

Enterokoklar, karın içi enfeksiyonlarda florada bulunmalarına rağmen, bu enfeksiyonlar genellikle enterokoklara etkisi olamayan antimikrobiyal ilaçlarla tedavi edilebilmektedir.

2.8.5. Yara ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokok genellikle karın içi ve pelvik yara enfeksiyonlarında bulunur, ancak bunlar genellikle polimikrobiyal olduklarından, bu tür durumlarda rollerini değerlendirmek zordur. Enterokoklar cerrahi yara, dikübitus ülseri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilmekle birlikte klinik olarak önemi tam olarak belirlenememiştir [67].

2.8.6. Menenjit

Önceden geçirilmiş kafa travması yada beyin ameliyatı gibi durumlarda, bakteriyemi düzeyi yüksek olan endokardit ve neonatal sepsisli hastalarla, AIDS ve akut lösemi gibi hastalarda enterokoklara bağlı menenjit görülebilir [67].

2.9. CRISPR-cas Tarihçesi

CRISPR-cas dizileri ilk kez 1987'de Ishino ve arkadaşları tarafından *E.coli* K12 suşunda tanımlanmıştır [68]. IAP (Apoptoz İnhibitör Proteini) geninin dizi analizi sırasında, 29 nükleotit (nt) uzunluğunda 14 tane tekrar kümeleri ile bu tekrarların arasında 32–33 nükleotitlik ara DNA bölgelerinin olduğu belirlenmiş ancak fonksiyonları tanımlanamamıştır [69].

2000 yılında Mojica ve diğerleri 20 farklı prokaryotun (arkea ve bakteri) genomunda tekrar dizilerini tanımlamışlardır [70]. 2002 yılında Jansen ve arkadaşları bu tekrar dizilerini CRISPR olarak adlandırmış, cas genlerini 1-4 olmak üzere sınıflandırmış ve cas genlerinin CRISPR bölgeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir [71].

2005 yılında birbirinden bağımsız 3 farklı araştırma grubu, CRISPR aralayıcı (spacer) bölgelerinin; bakteriyofaj DNA'sı, plazmit ya da transpozonlar gibi hareketli genetik elemanlarla homolog olduğunu göstermiştir [72-74]. Bu araştırmalar CRISPR-cas sisteminin RNA aracılı savunma sistemi olduğu hipotezini doğurmuştur.

CRISPR-cas sisteminin bakterinin yabancı nükleik asitlere karşı bir savunma sistemi olduğuna dair ilk çalışma 2007 yılında Barrangou ve ark. tarafından yapılmıştır. Bargau ve diğerleri *Streptococcus thermophilus* suşlarının CRISPR bölgesini sekanslayarak, bu DNA bölgesinin bakteriyi enfekte eden faj DNA'sından türetilen aralık kısımlarının bulunduğunu göstermiştir ve bu aralık kısımlarının sayısının faja karşı gösterilen direnç ile doğru orantılı olduğunu olduğunu bulmuştur [75]

2010 ve 2011 yıllarında yapılan farklı iki çalışmada cas 9'un cas gen kümeleri içerisinde hedef DNA'nın kesimini sağlayan tek enzim olduğu gösterilmiştir [76,77]. Yine 2011 yılında Sapranaukas ve diğerleri ilk defa Tip II CRISPR'ın aktarılabilir bir sistem olduğunu göstermiştir [78].

2012 yılında Jinek ve diğerleri CRISPR Tip II sisteminde, Cas9, tracrRNA ve crRNA'ların hedef DNA'yı tanımasına olanak sağladığını göstermiştir [79]. 2013 yılında memeli hücrelerinde CRISPR sistemleri ile genom düzenlemeleri gerçekleştirilebilmiş ve bu sayede CRISPR cas 9 sistemleri genom düzenleme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır [80].

CRISPR-cas sistemi yeni bir genom düzenleme mekanizması olarak çalışmaları günümüzde halen devam etmektedir.

2.10. CRISPR-cas Sistemleri

CRISPR-cas (Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri ve CRISPR ilişkili proteinler) bir çok arke ve bakteride bulunan faj ve virüs gibi dış kaynaklı genetik elementlere karşı bağışıklık sağlayan özel bir RNA/protein kompleksidir. Arkelerin yaklaşık %84'ünde, bakterilerinse yaklaşık %48'inde bulunur.

CRISPR sistemi, bir CRISPR dizisi (Palindromik tekrar dizileri ve Aralık bölgeleri), bir lider sekans ve cas genlerinden oluşur.

2.10.1. CRISPR dizisi

CRISPR dizisini, palindromik tekrar dizileri ve aralık bölgeler oluşturur.

Palindromik tekrar dizileri

Palindromik tekrar dizileri büyük oranda korunmuş olmasına rağmen türler arasında farklılık gösterebilir. 24-47 bç uzunluğundadır ve genellikle içinde 7-8 nükleotitli palindromik tekrar dizileri bulundurulur. CRISPR bölgesi içerisindeki tekrar bölgeleri birkaç tane olabildiği gibi yüzlerce de olabilmektedir [69, 71, 81- 83]

Aralık bölgeleri

Aralık bölgeler istilacı DNA (faj yada plazmit)'nın genetik materyalinden türevlenmiş dizilerdir. Bu dizilerin tekrar kümelerinin arasına girmesi ile CRISPR dizisi oluşur [72]. Yani istilacı DNA'nın bazı bölgeleri tekrar dizileri ile birlikte CRISPR bölgesine yerleştirilir.

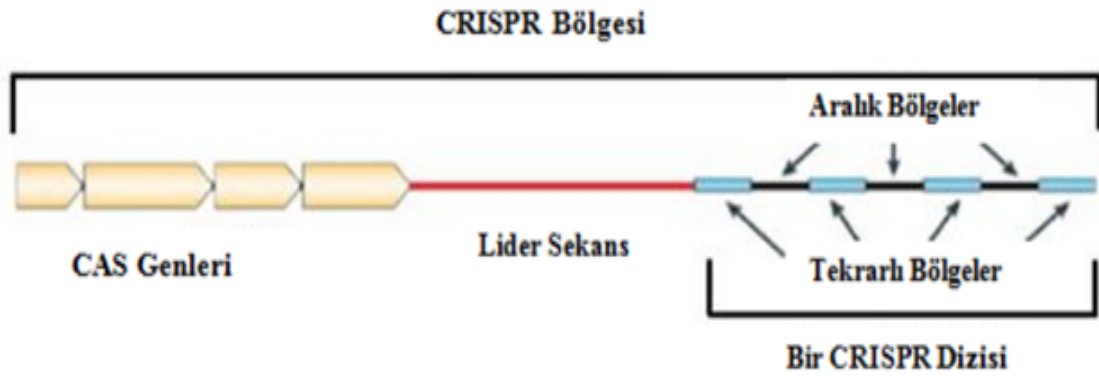
Aralık dizileri 26-72 bç uzunluğundadır. Bu proto-aralıklar tipik olarak, korunmuş kısa (2-5 nükleotitlik) PAM (Protospacer Adjacent Motif) dizilerine bitişiktir [84]. Aralayıcı bölgeler özelleşmiş bir genetik bellek olarak işlev yaparlar. Aralık bölgelerinin sayısı türden türe değişiklik gösterir. Bir türde bir kaç tane bulunabileceği gibi, yüzlerce de bulunabilir [85].

2.10.2. Lider sekans

Transkripsiyon yönünde CRISPR gen dizisinin gerisinde cas genlerinin önünde bulunur. 5' ucundadır ve dolayısıyla transkripsiyon 5' ucundaki lider diziden başlar. Adenin ve timin nükleotitlerince zengin bir dizidir [86]. Yeni eklenecek olan aralık bölgeleri lider dizisinin bulunduğu uçtan eklenir [87-89]. Lider dizilerin varlığı önceleri sadece *Methanocaldococcus jannaschii*, *Archaeoglobus fulgidus* ve *Methanothermobacter thermautotrophicus*'ta gözlenmiş ve daha sonra bir çok türde bulunduğu kanıtlanmıştır [89]

2.10.3. Cas genleri

Cas genleri, cas proteinlerini kodlar ve CRISPR aracılı immünitinin birçok basamağında görev yapar. CRISPR sisteminin aktivasyonu için cas genlerine ihtiyaç vardır [69]. Cas proteinleri endonukleaz, ekzonukleaz, helikaz özellikleri ve nükleik asit bağlanma bölgeleri (domainleri) sayesinde, DNA dizilerini açıp kesebilmektedirler [90].



Şekil 2.8. Bakteriyel kromozomda bir CRISPR bölgesi [58]

2.11. CRISPR-cas Çalışma Prensipleri

CRISPR-cas istilacı genetik elementlere karşı immüiteyi 3 aşamada sağlar:

- 1-Adaptasyon
- 2-Ekspresyon
- 3-İnterferans [91].

2.11.1. Adaptasyon

Adaptasyon evresinde istilacı DNA'ya ait olan kısa sekans dizileri CRISPR lokusuna entegre edilir. Faj yada plazmitin hücre içerisine girişi aralık dizisinin CRISPR lokusuna yerleştirilmesini tetikler. Aralık bölgesi yaklaşık 30 bp uzunluğundadır ve adaptasyon evresinde lider sekans tarafına yerleştirilir. Genellikle 1 fajdan, bir aralık bölgesi edinilir. Nadiren bir fajdan birden fazla aralayıcı bölge kazanımı da görülebilir. Her entegrasyon olayına bir tekrarın duplikasyonu eşlik eder ve böylece yeni bir aralık tekrar birimi oluşturulur.

İstilacı DNA’da bulunan PAM (protospacer-bitişik motifler) dizileri, aralık bölgesinin belirlenmesinde kullanılır. PAM dizileri istilacı DNA’da bulunan ön aralık dizilerinden hemen önce yer alan birkaç nükleotit uzunluğundaki dizilerdir. Aralayıcı öncüllerin (proto-aralayıcılar) seçimi, protospacer-bitişik motiflerin (PAM’ler) tanınması ile belirlenir. CRISPR-cas sisteminde bulunan tekrar dizileri PAM dizilerinden farklıdır. Bu sayede bakteri CRISPR sisteminde bulunan aralık dizileri ile faj DNA’sını ayırt edebilir.

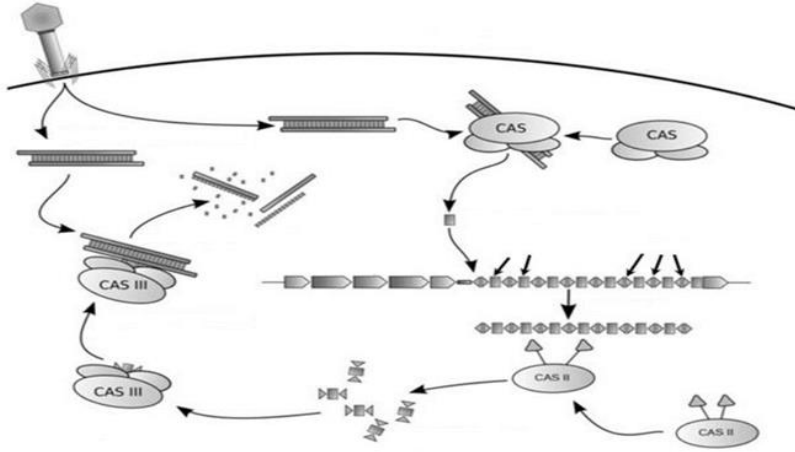
Bakteriyel CRISPR bölgesinde, PAM tanıma dizilerinin bulunmaması CRISPR-Cas sistemlerinin kendini hedefleme ve kendini kesme olasılığını ortadan kaldırırken PAM dizilerindeki mutasyonlar fajın CRISPR bağışıklığından kaçmasına izin vermektedir [92].

2.11.2. Ekspresyon

CRISPR-Cas aracılı bağışıklıktaki ikinci aşama ekspresyondur. Bu aşamada bir CRISPR lokusu (pr-crRNA) uzun primer transkripti, kısa crRNA içinde üretilir ve işlenir (Şekil 1). Ekspresyonda, CRISPR bölgesine yerleştirilen aralık dizilerinden öncül CRISPR RNA’lar (pre-crRNA) transkribe edilir. Oluşan pre-crRNA’lar cas endonükleazları tarafından virüsteki hedef sekanslara Watson-Crick baz eşleşmesi gösteren küçük crRNA’lara dönüştürülür. Bu endonükleazlar, daha büyük bir kompleksin alt birimi olarak ya da tek bir enzim olarak çalışabilir (Şekil 2) [83;93, 94].

2.11.3. İnterferans

Son aşama interferans aşamasıdır. Bu aşamada üretilen crRNA’lar sayesinde istilacı DNA hedeflenir ve cas nükleazlar ile kesilir. Bu sayede virüsler ve plazmidlerin çoğalması önlenir.



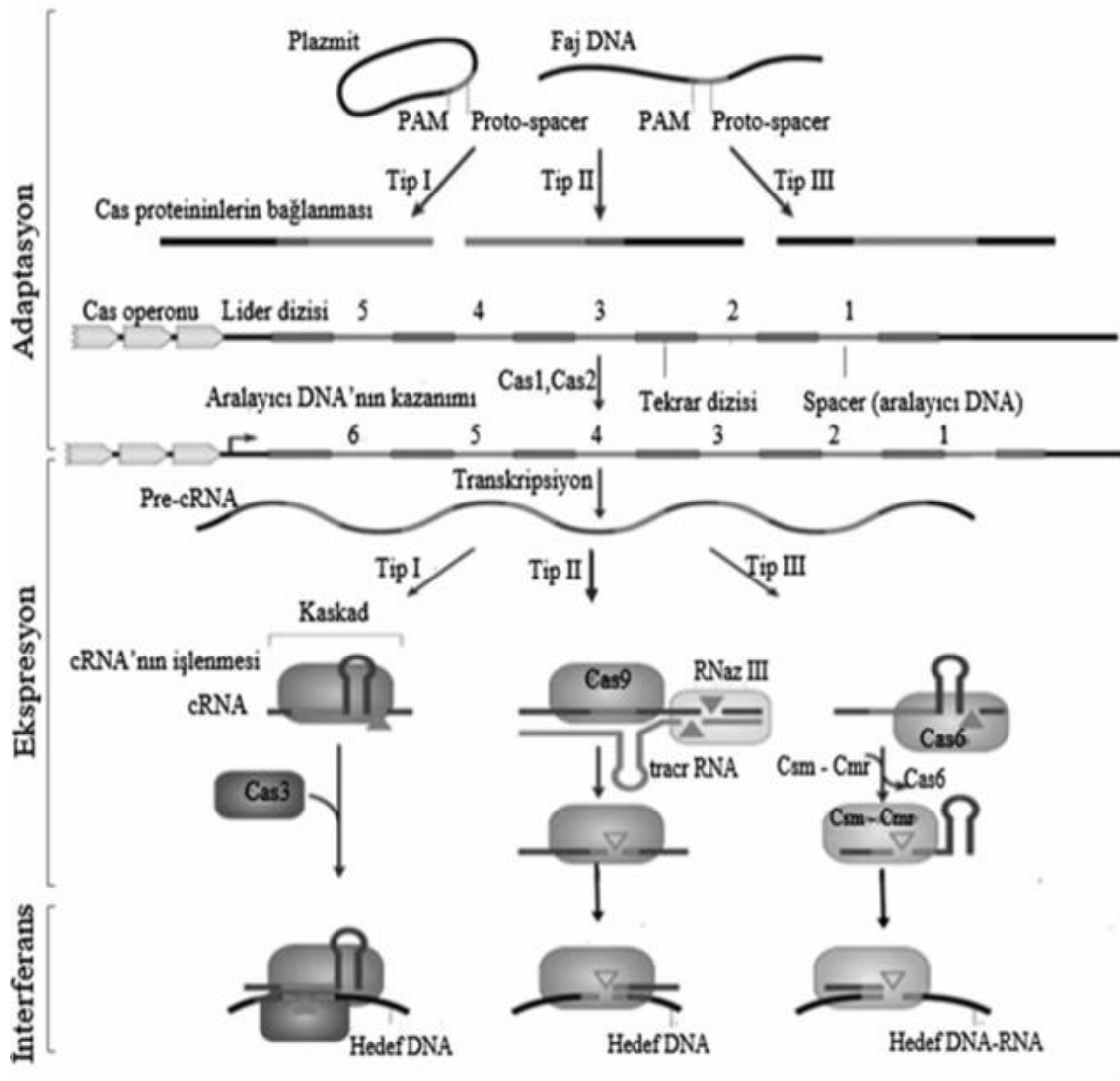
Şekil 2.9. CRISPR-cas sisteminin çalışma prensibi [86]

CRISPR-cas sisteminin çalışma prensibi yukarıdaki şekilde gösterilmiştir.

2.12. CRISPR-cas Tipleri

CRISPR bölgesinin organizasyonu ve cas genlerinin içeriğine göre, CRISPR-cas sistemleri 3 ana tipte ve 11 alt tipte sınıflandırılır [86]. Yaygınlığı az olan diğer üç tipten farklı Tip IV CRISPR-cas de bulunmaktadır. CRISPR-cas sistemlerinin sınıflandırılmasında, içerdikleri genler ve tipik lokus organizasyonlarından yararlanılmaktadır. Güncel olarak kullanılan CRISPR-cas sınıflandırması aşağıdaki gibidir [95].

1. Tip I	2. Tip II	3. Tip III
-Tip I A	-Tip II A	-Tip III A
-Tip I B	-Tip II B	-Tip III B
-Tip I C	-Tip II C	
-Tip I D		
-Tip I E		
-Tip I F		



Şekil 2.10. CRISPR-cas tipleri (Tip I, Tip II ve Tip III CRISPR-cas tipleri)

2.12.1. Tip I CRISPR-cas sistemi

Cas 1 ve Cas 2 proteinleri adaptasyondan sorumlu olan proteinler olduğu için tüm CRISPR-cas sistemlerinde bulunurlar. Bunun yanı sıra Tip I CRISPR-cas sistemleri helikaz proteinini kodlayan, cas3 gen bölgesi içerir. Cas 3 proteini hedef DNA'nın parçalanmasından sorumlu helikaz ve DNaz domainlerinden oluşur. Tip I sistemi hem bakterilerde hem de arkelerde bulunabilir [69].

Helikaz enzimi DNA-DNA ve DNA-RNA duplikasyonlarını ayırmak için tek iplikli DNA ile uyarılan ATPaz aktivitesine sahip bir enzimdir. Genellikle helikaz enzimi, bir endonükleaz aktivitesine sahip olan ve hedeflenen DNA'nın bölünmesine katılan HD domaini

ile desteklenir.

HD domeni, fosfohidrolaz aktivitesi olan bir enzim ailesidir. Bu enzim ailesi, nükleik asit metabolizmasında ve sinyal iletiminde rol oynar. HD domeni, Cas3 proteinlerinin N-ucunda bulunur veya cas3 helikaz ile aynı lokus içerisinde ayrı bir gen tarafından kodlanır. Helikaz ve HD nükleaz aynı lokusda bulunuyorlarsa, helikaz cas3' ve HD nükleaz ise cas 3'' olarak belirtilir. I-F tipi sistemlerde cas3 ayrıca cas2 genine eklenir.

Genellikle tip I sistemlerinde, cas1 ve cas2 genlerini içeren tek bir operon, Cascade veya efektör kompleksinin alt birimleri için büyük alt ünite ve küçük alt ünite içeren genler (genellikle büyük alt üniteye kaynaşmış), cas5 ve cas7 genleri ve crRNA öncesi transkript işlemeden doğrudan sorumlu olan cas6 içeren genler kodlanır. Tip I sistem operonlarındaki her gen genellikle tek bir kopya halinde bulunur. Tip I sistemler şu anda her biri kendi imza genine ve operon organizasyonunun farklı özelliklerine sahip olan I-A'dan I-F'ye altı alt tipe ayrılmıştır (Tip I-A'dan Tip I-F'ye).

Bu alt tiplerden IE ve IF cas4 bulundurmamasıyla diğerlerinden ayrılır. Bu alt tipler, Cas1 filogenisine göre ilişkilidir. Son zamanlarda, birkaç alt türle ortak özellikler paylaşan fakat farklı değişkenlerde içeren varyantlar tanımlanmıştır. Bu varyantlar mevcut alt türlerle ortak özellikler taşımasından dolayı mevcut sınıflandırma içerisine dahil edilmiştir. Örneğin birkaç tip, tip I-C varyantı ve türetilmiş bir tip I-F varyantı bulunmaktadır.

Ek olarak, bağımsız (cas1-cas2 gen çifti ile ilişkili olmayan) efektör komplekslerinin sayısı ve çeşitliliği de artmaktadır. Bu "solo" efektör kompleksleri genellikle plazmitlerde bulunur veya transpozisyon için gerekli olan bir DNA bağlayıcı protein olan TniQ / TnsD gibi transpozonlarla ilgili genlerle ilişkilidir. Bu tür vakaların çoğu I-F alt tipinin ve bazıları ise I-C alt tipinin türevleridir. [95]

Cas proteinleri crRNA biyogenezinden ve istilacı nükleik asitlerin tanınması ve yıkımından sorumlu olduğundan her CRISPR tipinin moleküler mekanizması özgünlük göstermektedir [86].

Tip I sistemlerinde olgun crRNA'ları üretmek üzere pre crRNA'ların tekrarlı sekanslarının endoribonükleolitik kesimi cas 6 nükleaz ailesine dayanmaktadır. Tip I sisteminde oluşan

crRNA molekülü cascade ve cas 3 proteinleri ile birleşerek yabancı DNA'yı kesmektedir [95] .

2.12.2. Tip II CRISPR-cas sistemi

Tip II CRISPR-cas sistemi Tip I ve Tip III'ün aksine sadece bakterilerde bulunmaktadır [48]. Tip I CRISPR-cas sisteminde olduğu gibi, Tip II'de de Cas1 ve Cas2 proteinleri bulunur ve adaptasyonda rol oynar. Tip II CRISPR-Cas sistemleri işaret geni, Cas9 ve bazen dördüncü proteini (Csn2 veya Cas4) kodlar. Cas 9, efektör komplekslerinin tüm fonksiyonlarını ve hedef DNA'nın kesilmesi ve crRNA'nın olgunlaşması için gerekli olan proteini kodlar.

Tip II sistemler "HNH" sistemleri olarak da bilinir. Cas1, Cas2 ve Cas9 proteinlerini kodlayan genlere ek olarak, tip II lokuslarının büyük çoğunluğu tracrRNA (trans aktive edici CRISPR RNA) için bir veya iki geni kapsar. Bu sistemler pre-crRNA'nın işlenmesi için CRISPR-cas lokusunda kodlanmayan hücresel RNase III ve tracrRNA'yı kullanırlar. Büyük Cas9 proteini (~ 800-1.400 amino asit), iki nükleaz domaini, yani proteinin ortasında bulunan RuvC benzeri nükleaz (RNase H katlanması) ve HNH (McrA benzeri) nükleaz domainini içerir. Her iki nükleaz da hedef DNA'nın parçalanması için gereklidir.

CRISPR-cas mekanizmaları içerisinde en çok çalışılan sistem tip II sistemidir. Son yapılan çalışmalarda cas 9'un kristal yapısı çözülmüştür. Bu yapıya göre cas 9 yapay bir tek kılavuz RNA (sgRNA) ve bir hedef DNA içermektedir.

Tip II sistemleri Tip II A, Tip II B, Tip II C olmak üzere 3 alt tipte sınıflandırılır. Tip II-A sistemleri, bu alt tip için bir işaret geni olarak kabul edilen csn2 olarak bilinen ek bir geni kapsar. Csn2 proteinin aralık dizi entegrasyonunda tam olarak belirlenemeyen bir rolü olduğu düşünülmektedir. Csn2 proteinleri, doğrusal çift sarmallı DNA'yı merkezi delikten bağlayan homotetramerik halkalar oluşturur. Bu proteinin, ATP-bağlanma bölgesinin inaktive edilmiş görüldüğü yüksek türevli bir P-loop ATPase katını benimsediği gösterilmiştir. Csn 2'nin yapısal ve biyokimyasal karakterizasyonunun tanımlandığı çok çeşitli alt tipleri tanımlanmıştır.

Tip II-B sistemleri csn 2 gen bölgesini bulundurmazlar fakat Tip I-A 'dan Tip I-D'ye kadar olan alttiplerle ilişkili olan Cas 4 familyasına ait dördüncü bir gene sahiptir. Cas4 proteinleri

PD-EDxK nükleaz ailesindendir ve 5'-tek iplikli DNA eksonükleaz aktivitesine sahiptir Cas4 proteinlerinin CRISPR-Cas sistemlerindeki gerçek rolü hala bilinmemektedir.

Son zamanlarda önerilen tip II-C CRISPR-Cas sistemleri sadece üç protein kodlayan gen içerir (cas1, cas2 ve cas9) ve bakteri genlerinde yaygındır [95]

Yapılan çalışmalarda cas9'un yabancı DNA'ların parçalanmasından sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Bu sayede TipII CRISPR-cas sistemleri gen düzenlemede kullanılabilir hale gelmiştir. Son zamanlarda, tip II sistemleri, büyük bir biyoteknolojik potansiyeli olan güçlü bir genom düzenleme ve mühendislik aracı olarak geliştirilmiştir.

2.12.3. Tip III CRISPR-cas sistemi

Tip I CRISPR- cas sisteminde olduğu gibi Tip III'de hem bakterilerde hem de arkelerde bulunabilir [69]. Tip III sistemlerinin tümü, cas 10 içerirler.

Cas10, tip III sistemlerinin efektör komplekslerinin büyük alt birimidir. Her tip III lokusu ayrıca küçük alt ünite için bir gen, bir Cas5 grubu RAMP proteini için bir gen ve Cas7 grubunun RAMP proteinleri için genellikle birkaç gen gibi efektör komplekslerinin diğer alt birimlerini kodlar.

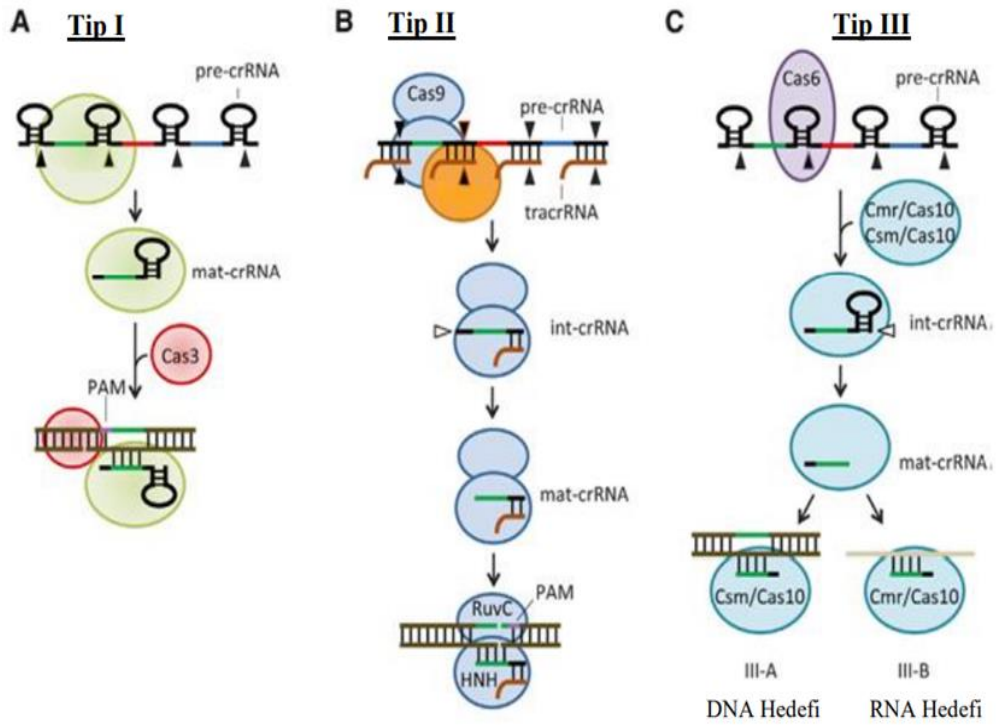
Tip III CRISPR-Cas sistemleri genellikle cas1 ve cas2 genlerini kodlamaz, ancak tip I veya tip II sistemlerle ilişkili CRISPR dizilerinden üretilen crRNA'ları kullanır. Bununla birlikte, tip I ve tip II sistemlerin bulunmadığı birçok genomda, cas1, cas2 ve cas6 genleri, buna göre tamamen işlevsel olduğu tahmin edilen bir tip III sisteme bağlanır.

Tip III'ün Tip III-A ve Tip III-B olmak üzere iki alt tip vardır. Bunlar csm2 ve cmr5 gibi farklı genlerin varlığı ile ayırt edilebilirler.

III-A alt tipi türü genellikle cas1, cas2 ve cas6'ya sahiptir ve DNA'yı hedeflediği gösterilmiştir, halbuki III-B sistemlerinin çoğu bu genlerden yoksundur ve bu nedenle aynı genomda bulunan diğer CRISPR-Cas sistemlerine bağlıdır.

III-B tipi CRISPR-Cas sistemlerinin RNA'yı hedef aldığı gösterilmiştir. Tip III CRISPR-Cas

sistemlerinin bileşimi ve organizasyonu, tip I sistemlere kıyasla çok daha çeşitlidir. Çeşitlilik, gen kopyaları ve silmeleri, alan girişleri ve füzyonları ve muhtemelen efektör komplekslerinde veya ilişkili bağışıklıkta yer alan ilave, zayıf şekilde karakterize edilmiş alanların varlığı ile sağlanır. III-B tipi varyantın ayırt edici özelliği, Cas10'un palm / siklaz domaininin görünürde etkisiz hale gelmesidir; oysa, III-A tipi varyantlar, tipik olarak HD bölgesinden yoksun bir Cas10 genini kapsar. Her iki tip III varyantı tipik olarak diğer CRISPR-Cas sistemleri ile birlikte bir genomda bulunur [95].



Şekil 2.11. Tiplerine göre CRISPR-cas mekanizmaları [94]

2.12.4. Tip IV CRISPR-cas sistemleri

Bazı bakteriyel genomlarda bulunmasına rağmen, genellikle plazmidlerde bulunan Tip IV CRISPR-Cas sistemleri, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270'deki CRISPR-Cas lokusu ile tanımlanabilmektedir. Tip III-A'da olduğu gibi Tip IV CRISPR-cas sistemleri de cas 1 ve cas 2 içermez ve genellikle aralık genleri ile ilişkili değildir. Ayrıca, aralık bölgeleri bulundurmamasına rağmen bir çok bakteride bulunan tek CRISPR-Cas sistemidir. Tip IV sistemleri, büyük bir alt birim (csf1), Cas5 (csf3) ve Cas7 (csf2) gruplarının RAMP proteinlerini (repeat-associated mysterious proteins, RNA tanıma motifi (RRM) alanını

içeren proteinlerin üst ailesi) içeren iki genden oluşur. Bazı durumlarda, küçük altbirim için de bir gen bulundurabilir. Csf 1 geni Tip IV CRISPR-cas için işaretgeni olarak düşünülebilir.

Tip IV sistemlerinin 2 farklı alt tipi vardır. Bunlardan biri bir DinG familyası helikaz csf4'ü içerirken, ikinci alt tip DinG'den yoksundur, ancak tipik olarak küçük bir alfa heliks proteini, muhtemelen küçük bir alt birim için bir gen içerir.

Tip IV CRISPR-Cas sistemlerinde, CRISPR bölgesine aralık bölgeleri dahil edilmeden, doğrudanyabancı RNA'dan crRNA'lar üretilir [94].

2.12.5. CRISPR-cas tiplerinin mekanizmalarının karşılaştırılması

CRISPR-cas tipleri, bağışıklık sağlamada ortak bir işlevi paylaştıklarına rağmen, CRISPR-Cas sistemleri, özellikle crRNA biyogenez ve interferans için olağandışı mekanik çeşitlilik gösterir [86]. Örneğin, hem Tip I hem de Tip III sistemlerinde Cas6 nükleaz ailesi küçük olgun crRNA'ların oluşturulmasında pre-crRNA'nın tekrar dizileri içerisinde endoribonükleolitik kesimi gerçekleştirir. Tip II CRISPR-Cas sistemlerinde pre-crRNA transkriptlerinin işlenmesi, küçük bir transaktif edici bir crRNA (tracrRNA) ile pre-crRNA'nın tekrar segmenti arasındaki baz eşleşmesini ve ardından endojen bir RNaseIII'ün tekrarlanan bölgedeki kesimidir [77-78, 91-92]. Aynı zamanda CRISPR bağışıklığının interferans mekanizmaları arasında da farklılıklar bulunur.

Tip I sistemlerinde; tamamlayıcı DNA hedef dizilerine bağlanma ve ipliklerin açılması ve DNA'nın kesimini gerçekleştiren **trans**-aktif edici nükleaz-helikazın toplanma işlemi olan antiviral savunmada (cascade), olgun crRNA, CRISPR ilişkili kompleksi oluşturmak üzere çok sayıda Cas proteinleri ile birleşir. Benzer şekilde, Tip III sistemleri, akraba crRNA'ların hedefDNA veya RNA'ya yönlendirdiği Csm (III-A) ve Cmr (III-B) kompleksleri olarak bilinen büyük çokluprotein topluluklarını kullanır.. Aksine, Tip II sistemleri, bir crRNA ve bir tracrRNA'dan oluşan doğal bir çift RNA heterodupleksinin yönlendirdiği DNA hedeflenmesi ve parçalanmasında Cas9 kullanır. İkili crRNA: tracrRNA, bağlayıcı sekans ile crRNA'nın 3' ucu ile tracrRNA'nın 5' ucuna bağlandığında kimerik kılavuz RNA oluşur. RNA'daki 20-nükleotidlik kılavuz dizisi hedef DNA dizisi ile birleşir ve bu dizinin parçalanması için Cas9 yönlendirilir [78, 91].

Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homoloji yönelimli onarım (HDR) ile tamir edilebilen ökaryotik hücrelerin genomlarında bölgeye özgü çift sarmallı (ds) DNA kırıklarının oluşturulmasında Cas9 ve tek kılavuzlu RNA'lar kullanılmıştır, böylece yere özgü ve kalıcı genom değişiklikleri oluşur. Kılavuz RNA'daki DNA hedefine bağlanma dizisi değiştirilerek, Cas9, bir PAM motifine bitişik bir hedef DNA bölgelerinden herhangi birini hedeflemesi veya kesmesi için programlanabilir. Bu iki bileşenli CRISPR-Cas9 sistemi araştırmacılara çok çeşitli organizmalarda genomun düzeltilmesi ve gen düzenlenmesinde basit, ama etkili bir yöntem sağlar. [91].

Çizelge 2.4. CRISPR-cas çeşitlerinin karşılaştırılması [92]

CRISPR-cas Alt tipleri	Cas 1 monofiletik	İmza geni	Yorum
Tip I A	Hayır	Cas8a2, Csa5	Cas1 ve Cas2'nin yanı sıra Cas3 geni de bulundurulur. Cas3, genellikle, HD nükleaz domain (3') ve helikaz domenine(3'') bölünür. Bunun yanında küçük alt birim Csa5 için genellikle ayrı bir gen bulunur. Cas1-Cas2-Cas4 modüllerine sahip hibrit sistemler ve bir Cascade modülü bulundurulur.
Tip I B	Hayır	Cas8b	Genellikle Cas3 geni bölünmez
Tip I C	Hayır	Cas8c	Bu sistemler genellikle bir cas6 genine sahip değildir. Cas5 katalitik olarak aktiftir ve Cas6 fonksiyonunu değiştirir.
Tip I D	Hayır	Cas10d	HD alanı, Cas3 ile değil, büyük alt birim ile ilişkilidir.
Tip I E	Evet	Cse1, Cse2	Cas4 geni bu sistemle ilişkili değildir.
Tip I F	Evet	Csy1, Csy2 Csy3,Cas6f	Cas4 geni bu sistemle ilişkili değildir ve cas2 cas3'e bağlanmıştır. Küçük alt birim için ayrıca bir gen bölgesi yoktur ya eksiktir yada büyük alt birim ile kaynaşmıştır.
Tip II A	Evet	Csn2	. En az beş ayrı Csn2 ailesi bulunmaktadır.
Tip II B	Evet	Cas9 (Csx12 alt aile)	Cas1_2_9'a ek olarak cas4 içeren dört gen bulundurulur.
Tip II C	Hayır	N/A	II-C operonunda sadece üç gen bulunur - cas1_2_9.
Tip III A	Hayır	Csm2 (küçük alt birim)	Csm modülü olarak da bilinir ve Cas10 içerir.
Tip III B	Hayır	Cmr5 (küçük alt birim)	Cmr (veya RAMP) modülü olarak da bilinir ve Cas10 içerir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Polimeraz zincir reaksiyonu solüsyonları

10X PZR tamponu

25 mM MgCl₂,

25'er mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı

5 U/μL Taq DNA Polimeraz

Tüm solüsyonlar -160C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

Primerler

Enterokok izolatlarında virulans faktörleri ve CRISPR lokuslarının varlığının değerlendirilmesinde 11 primer çifti kullanılmıştır.

Primer dizileri aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.1. Virulans faktörlerini kodlayan genlerin PZR belirlenmesinde kullanılan primerler

Gen	Primer Dizileri (5'→3')	Amplikon büyüklüğü (bç)
<i>esp</i>	F-AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG R-AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510 bç
<i>hyl</i>	F-ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG R-GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276 bç
<i>cob</i>	F-AACATTCAGCAAACAAAGC R-TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1405 bç
<i>gelE</i>	F- AATTGCTTTACACGGAACGG R- AGCCATGGTTTCTGGTTGTC	547 bç
<i>sprE</i>	F- CTTGTCTGCAAATGCAGAAG R-CGCCATTGGAATGAACACCA	660 bç
<i>fsrB</i>	F- GTTTGTCCCATCCATTGTCC R- TTTATTGGTATGCGCCACAA	346 bç

Çizelge 3.1. (devam) Virulans faktörlerini kodlayan genlerin PZR belirlenmesinde kullanılan primerler

Gen	Primer Dizileri (5'→3')	Amplikon büyüklüğü (bç)
CRISPR1-cas	F-GCGATGTTAGCTGATACAAC R-CGAATATGCCTGTGGTGAAG	315 bç
CRISPR1-cas csn1	F-CAG AAG ACTATC AGT TGG TG R-CCT TCT AAA TCT TCT TCA TAG	783-bç
CRISPR2	F-CTGGCTCGCTGTTACAGCT R- GCCAATGTTACAATATCAAACA	Değişken
CRISPR3-cas	F- GATCACTAGGTTTCAGTTATTTC R- CATCGATTTCATTATTCCTCCAA	224 bç
CRISPR3-cas csn1	F-GCT GAA TCT GTG AAG TTA CTC R-CTG TTT TGT TCA CCG TTG GAT	258-bç

3.1.1. Tris- borik asit- EDTA (TBE) tamponu

10XTBE tamponunu hazırlanışında kullanılan malzemeler:

108 g Tris base [tris (hidroksi metil) aminometan] (Merck)

55 g Borik asit (Merck)

7.5 g EDTA, disodyum tuzu (Merck)

Deiyonize su

10XTBE tamponunun hazırlanışı

Tris, borik asit ve EDTA 800 ml deiyonize suda çözüldü. Solusyonun pH'sı 8.3'e ayarlandı. 10X tamponu oda sıcaklığında saklandı.

1XTBE hazırlanışı

10 ml. 10XTBE stok solusyonu 1 L deiyonize su ile dilue edilerek hazırlandı.

% 2'lik agaroz jel hazırlanışı

2 gr agaroz ve 100 ml 1XTBE tamponu içeren karışım mikro dalga fırında eritildi. Agaroz uygun sıcaklığa gelince 10 µl etidyum bromür eklendi ve jel kalıbına döküldü.

3.2. Yöntem

3.2. 1. Enterokok izolatları

Bu çalışmada Ocak 2019-Mayıs 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Hastanesinde çeşitli kliniklerden gönderilen 130 klinik enterokok suşu (14 kan, 79 idrar, 17 yara, 5 periton sıvısı, 2 diren, 1 BOS, 12 diğer) toplanmıştır. Tüm suşlar VİTEK 2 (bioMerieux, Fransa) identifikasyon yöntemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak belirlenmiştir [97].

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA katı besiyerinden alınan bakteri kolonilerinin 1000 µl distile su ile karıştırılarak 10 dk 95°C’de kaynatılmasıyla elde edildi. DNA örnekleri -16 °C ‘de muhafaza edildi.

3.2.3. Virülans faktörleri polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi

Esp ve *hyl* virülans faktörleri multipleks PZR (mPZR) yöntemi ile diğer virülans faktörleri monopleks PZR ile çoğaltıldı. PZR uygulamalarında negatif kontrol ve pozitif kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212) kullanıldı. PZR reaksiyonu aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. *Esp* ve *hyl* multipleks PZR karışımı

10X tampon	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
Primer <i>esp</i> + <i>hyl</i>	0,25 µl + 0,25 µl = 0,5 µl
dNTP	0,2 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Distile Su	19,05 µl
Toplam Hacim	25 µl

Esp ve *hyl* multipleks PZR karışımı yukarıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. *Cob*, *gelE*, *fsrB*, *sprE* PZR karışımı

10X tampon	5 µl
MgCl ₂	5 µl
Primer	0,5 µl
dNTP	0,2 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Distile Su	39,05 µl
Toplam Hacim	50 µl

Virülans faktörleri aynı PZR programı ile çoğaltılmıştır. Virülans faktörlerinin PZR programı aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Virülans faktörleri PZR programı [57]

Basamak	Süre	Sıcaklık	
Ön denatürasyon	5 dk	95°C	
Denatürasyon	50 sn	95°C	30 döngü
Bağlanma	50 sn	54°C	
Uzama	1 dk	68°C	
Son Uzama	10 dk	72°C	

3.2.4. CRISPR-cas (CRISPR1-cas, CRISPR2-cas ve CRISPR3-cas) ve PZR

CRISPR lokuslarının çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.5. CRISPR-cas lokus PZR karışımı

10X tampon	5 µl
MgCl ₂	5 µl
Primer	0,5 µl
dNTP	0,2 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl
Distile Su	39,05 µl
Toplam hacim	50 µl

CRISPR-cas lokus PZR programı aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.6. CRISPR-cas lokus PZR programı

Basamak	Süre	Sıcaklık	
Ön denatürasyon	2dk	94 °C	
Denatürasyon	1dk	94 °C	30 döngü
Bağlanma	1dk	51 °C	
Uzama	1dk	72 °C	
Son Uzama	10dk	72 °C	

CRISPR-cas lokus PZR reaksiyonunda bir pozitif (*E. faecalis* 29212) ve negatif kontrol (DNA eklenmemiş) kullanılmıştır [98].

3.2.5. Amplifiye ürünlerin agaroz jel elektroforezinde değerlendirilmesi

% 2'lik agaroz jele 10 µl amplifiye ürün ve 100 bç DNA belirteci brom fenol mavisi ile karıştırılarak yüklendi.

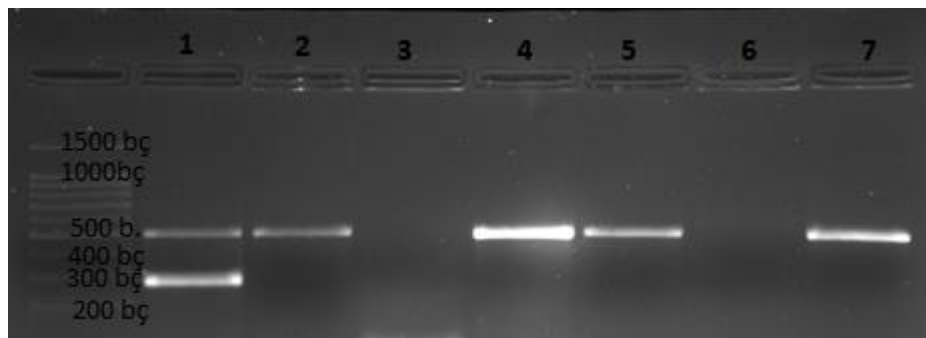
Virulans faktörleri ve CRISPR-cas lokuslarının beklenen amplifiye ürünlerinin büyüklüklerine göre 100 bç'lik DNA belirteci (Bioron GmbH, Germany) yardımıyla virulans faktörleri ve CRISPR-cas gen/lokuslarının varlığı belirlendi. Jel elektroforezi ~2 saatte tamamlandı ve jel görüntüleri Kodak GelLogic 200 kamerası ile kaydedildi.

Çizelge 3.7. Virulans faktörleri ve CRISPR lokus bant büyüklükleri [57, 60, 98]

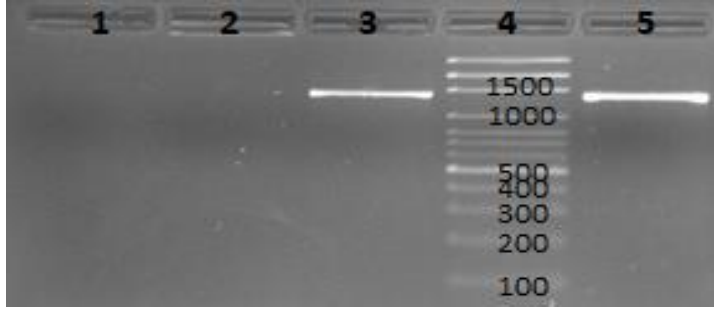
Gen	Amplikon büyüklüğü (bç)
<i>esp</i>	510 bç
<i>hyl</i>	276 bç
<i>cob</i>	1405 bç
<i>gelE</i>	547 bç
<i>sprE</i>	660 bç
<i>fsrB</i>	346 bç
CRISPR1-cas	315 bç
CRISPR1-cas-csn1	783 bç
CRISPR2	Değişken
CRISPR3-cas	224 bç
CRISPR3-cas-csn1	258 bç

Virülans faktörleri ve CRISPR-cas lokuslarının tespit edilmesinde yararlanılan bant büyüklükleri yukarıdaki çizelgede verilmiştir.

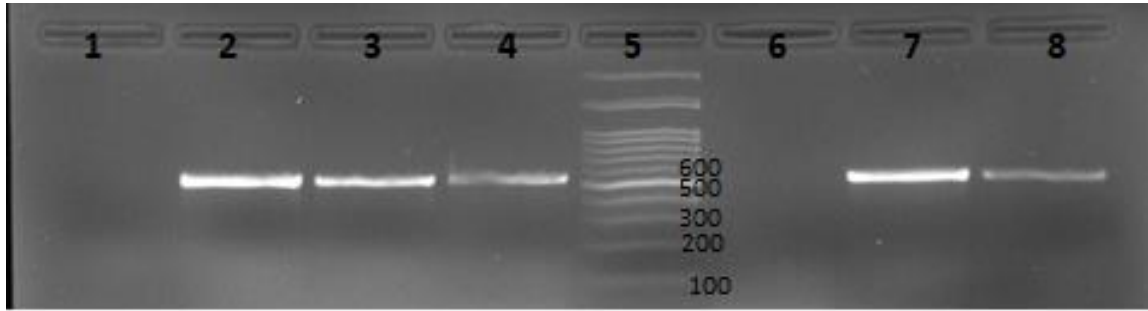
130 enterokok izolatının virulans faktörleri ve CRISPR-cas lokus/genlerinin agoroz jel elektroforez görüntüleri aşağıda verilmiştir.



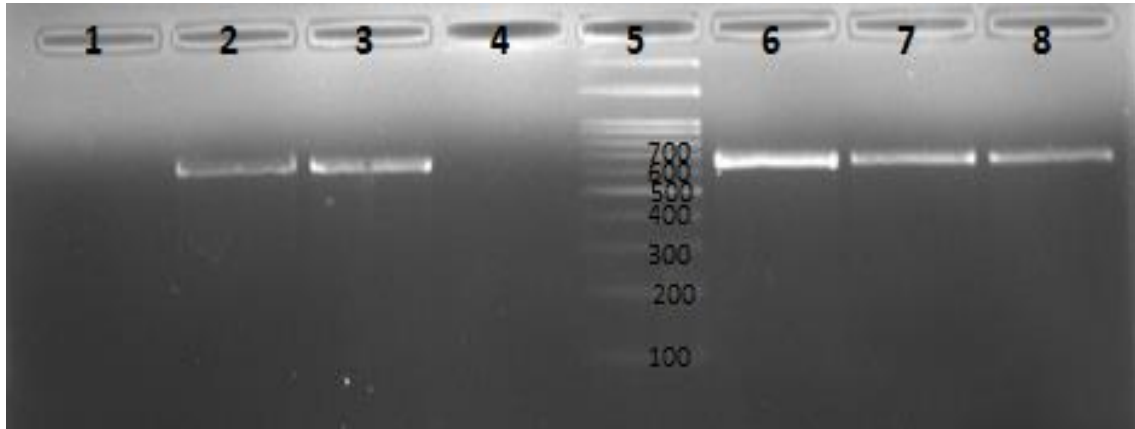
Şekil 3.1. *esp-hyl* agoroz jel görüntüsü: (1) *esp-hyl* pozitif kontrol, (2,4,5,7) *esp* gen bölgesi bakımından pozitif örnekler, (3,6) negatif örnekler.



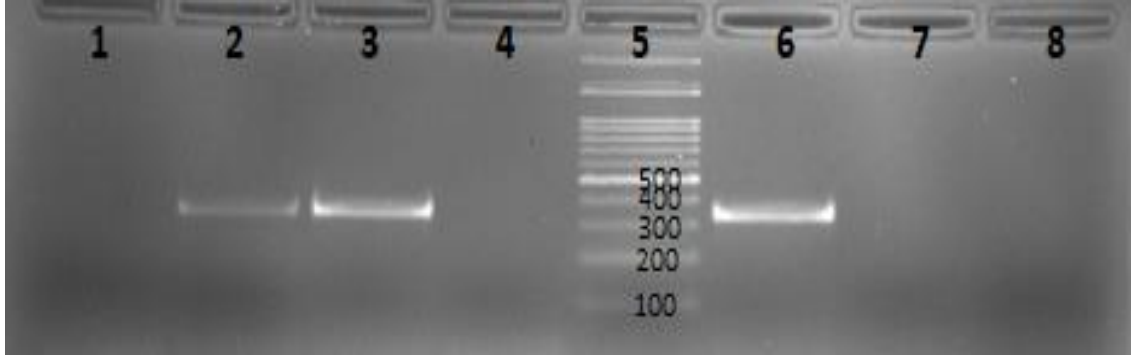
Şekil 3.2. *cob* agaroz jel görüntüsü: (1) negatif kontrol, (2) *cob* gen bölgesi bakımından negatif örnek, (3) *cob* gen bölgesi bakımından pozitif örnek, (5) pozitif kontrol.



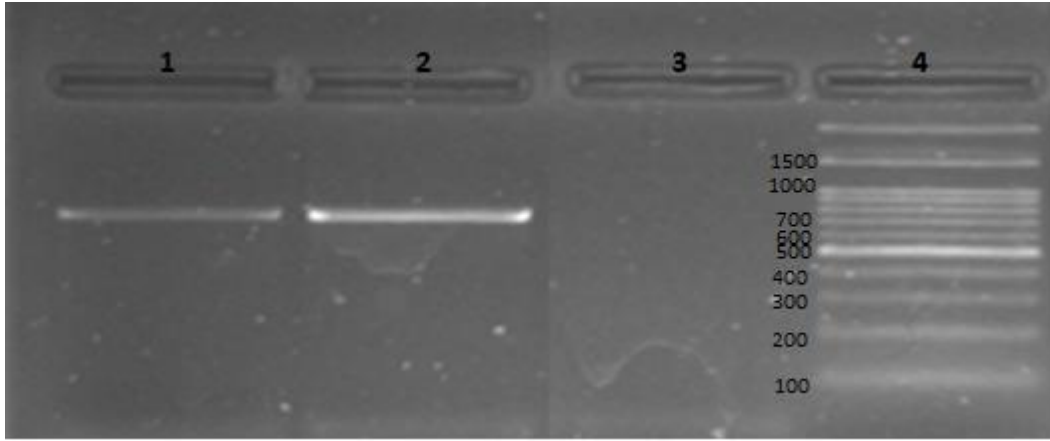
Şekil 3.3. gel E agaroz jel görüntüsü: (1) negatif kontrol, (2) pozitif kontrol, (3,4,7,8) gel E gen bölgesi bakımından pozitif örnek, (6) gel E gen bölgesi bakımından negative örnek.



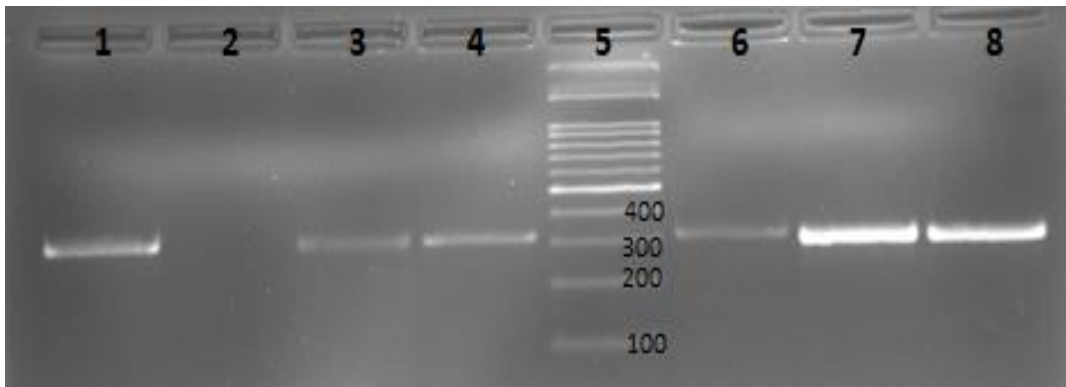
Şekil 3.4. spr E agaroz jel görüntüsü: (1) negatif kontrol, (2) pozitif kontrol, (3,6,7,8) spr E gen bölgesi bakımından pozitif örnek, (4) spr E gen bölgesi bakımından negative örnek.



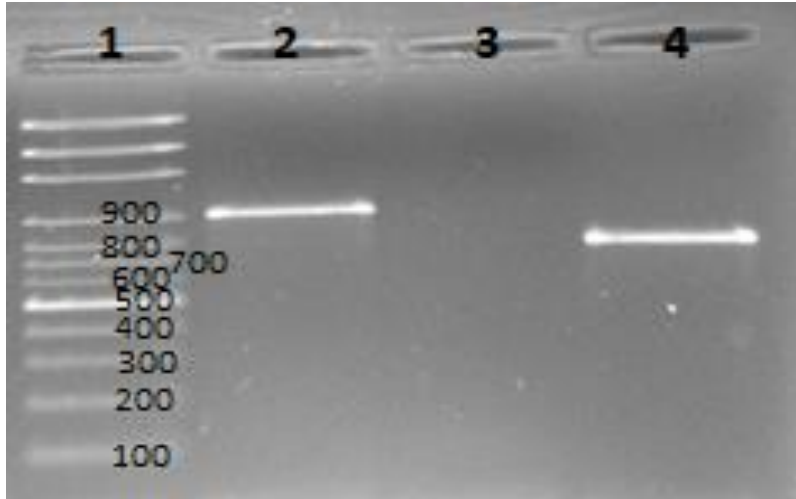
Şekil 3.5. *fsr B* agaroz jel görüntüsü: (1) negatif kontrol, (2) pozitif kontrol, (3,6) *fsr B* gen bölgesi bakımından pozitif örnek, (4,7,8) *fsr B* gen bölgesi bakımından negatif örnek.



Şekil 3.6. CRISPR1-cas *csn 1* agaroz jel görüntüsü: (1) pozitif kontrol, (2) CRISPR 1-cas-*csn1* gen bölgesi bakımından pozitif örnek, (3) negatif kontrol.



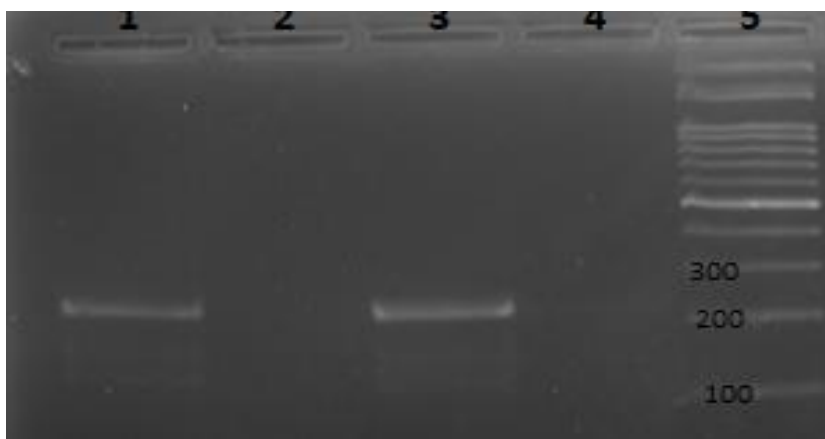
Şekil 3.7. CRISPR 1-cas lokuslarının korunmuş gen bölgeleri agaroz jel görüntüsü: (1) pozitif kontrol, (2) negatif kontrol, (3,4,6,7,8) CRISPR 1-cas korunmuş gen bölgesi bakımından pozitif örnek.



Şekil 3.8. CRISPR 2 agaroz jel görüntüsü: (1) pozitif kontrol, (2) negatif kontrol, (3) CRISPR2 gen bölgesi bakımından negatif örnek, (4) CRISPR 2 gen bölgesi bakımından pozitif örnek



Şekil 3.9. CRISPR 3-csn 1 agaroz jel görüntüsü: (1) pozitif kontrol, (2) negatif kontrol, (3,4) CRISPR 3-cas-csn1 gen bölgesi bakımından negatif örnek.

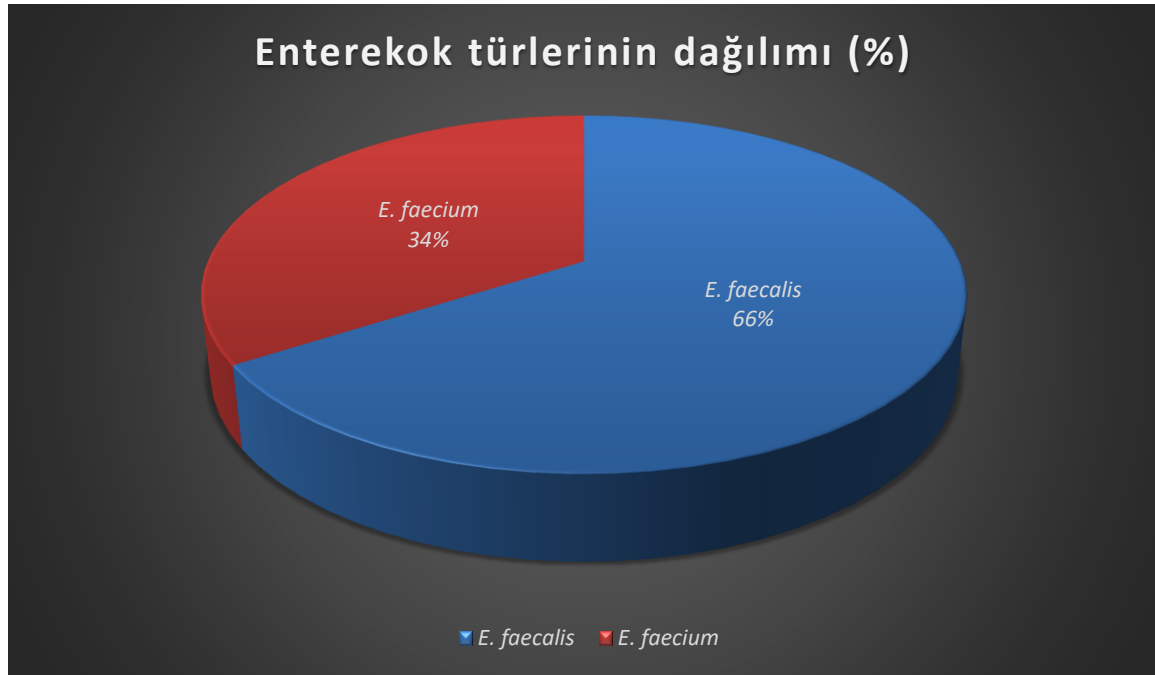


Şekil 3.10. CRISPR 3-cas lokuslarının korunmuş gen bölgeleri agaroz jel görüntüsü: (1) pozitif kontrol, (2) negatif kontrol, (3) CRISPR3-cas korunmuş gen bölgesi bakımından pozitif örnek, (4) CRISPR 3-cas korunmuş gen bölgesi bakımından negatif örnek

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

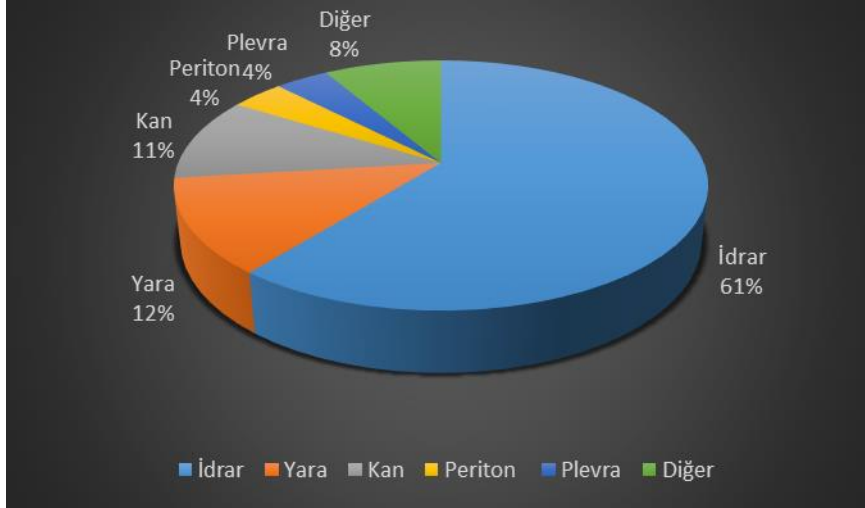
Bu çalışma farklı kökenli enterokok izolatlarında tanımlanan virülans faktörlerinin ve CRISPR lokuslarının dağılımının değerlendirilmesinde epidemiyolojik bir yaklaşım kullanıldı. Bu strateji, CRISPR lokusları ve virülans faktörlerinin nadir veya yaygın olup olmadığını ve ne tür izolatlarda mevcut olduğunu belirledi.

Ocak 2019- Mayıs 2019 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli kliniklerden gelen 130 vankomisin duyarlı enterokok toplandı. 130 örnekten 85'inde *E. faecalis* ve 45'inde *E. faecium* suşu izole edildi.



Şekil 4.1. Enterokok suşlarının tür düzeyinde dağılımı

Bu örneklerin 79 idrar, 16 yara, 2 safra, 1 pü, 5 plevra sıvısı, 5 periton sıvısı, 2 kateter ucu, 14 kan (kateter içi kan), 1 doku, 2 diren, 1 BOS ve 1 abse kültüründen izole edilmiştir.



Şekil 4.2. Klinik enterokok örneklerinin material çeşitine göre dağılımı

Klinik enterokok örnekleri 4 yeni doğan, 24 üroloji, 1 ortopedi, 1 onkoloji, 7 nöroloji, 8 nefroloji, 4 medikal onkoloji, 1 koroner, 3 kardiyoloji, 4 kalp damar hastalıkları, 3 kadın hastalıkları, 1 hematoloji, 4 göğüs hastalıkları, 2 geriatri, 10 genel cerrahi, 3 gastroenteroloji, 8 acil, 3 enfeksiyon hastalıkları, 3 endokrinoloji, 1 dermatoloji, 12 dahiliye, 18 çocuk hastalıkları, 1 çocuk acil, 3 anestezi ve reaminasyon, 1 beyin ve sinir cerrahi kliniğinden temin edildi.

İzolatların kliniklere göre dağılımı çizelge 4.1’de verilmiştir.

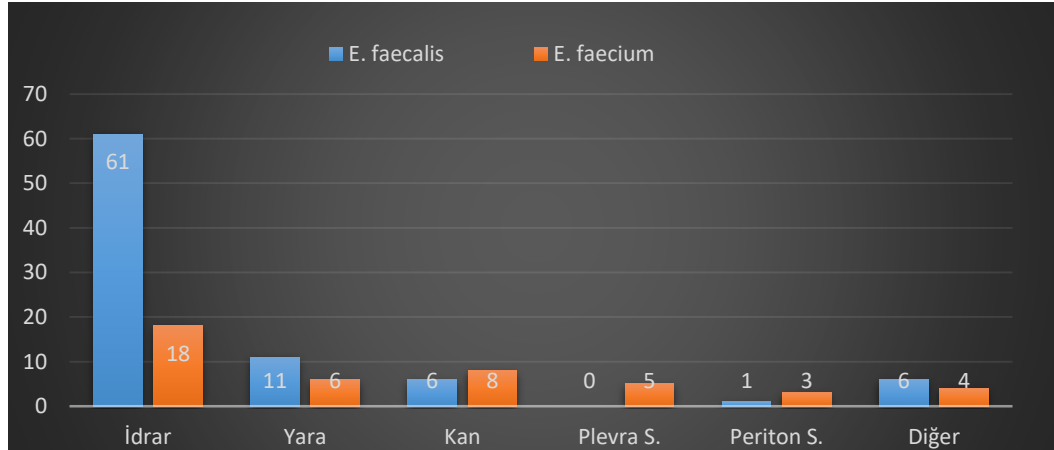
Çizelge 4.1. Ocak 2019- Mayıs 2019 tarihleri arasında toplanan izolatların kliniklere göre dağılımı

Klinik Adı	Sayısı
Enterokok türü	
Erişkin Acil	
<i>E. faecalis</i>	7
<i>E. faecium</i>	1
Anestezi ve Reaminasyon Yoğun Bakım	
<i>E. faecalis</i>	1
<i>E. faecium</i>	2
Beyin ve Sinir Cerrahisi	
<i>E. faecalis</i>	0
<i>E. faecium</i>	1
Çocuk Gastroenteroloji	
<i>E. faecalis</i>	1
Çocuk Acil	
<i>E. faecium</i>	1
Çocuk Cerrahisi	
<i>E. faecalis</i>	3
<i>E. faecium</i>	2
Çocuk Enfeksiyon	
<i>E. faecalis</i>	1
Çocuk Hastalıkları Kliniği	
<i>E. faecalis</i>	5
<i>E. faecium</i>	2
Çocuk Hematoloji	
<i>E. faecium</i>	1
Çocuk Metabolizma	
<i>E. faecalis</i>	1
Çocuk Nefroloji	
<i>E. faecalis</i>	4
<i>E. faecium</i>	1
Çocuk Yoğun Bakım	
<i>E. faecalis</i>	1
Dahiliye	
<i>E. faecalis</i>	5
<i>E. faecium</i>	7
Dermatoloji	
<i>E. faecalis</i>	1
Endokrinoloji	
<i>E. faecalis</i>	2
<i>E. faecium</i>	1
Enfeksiyon	
<i>E. faecalis</i>	3
Genel Cerrahi	
<i>E. faecalis</i>	3
<i>E. faecium</i>	6

Çizelge 4.1. (devam) Ocak 2019- Mayıs 2019 tarihleri arasında toplanan izolatların kliniklere göre dağılımı

Klinik Adı	Sayısı
Enterokok türü	
Gastroenteroloji	
<i>E. faecalis</i>	1
<i>E. faecium</i>	2
Geriatri	
<i>E. faecalis</i>	1
<i>E. faecium</i>	1
Göğüs Hatalıkları	
<i>E. faecalis</i>	2
<i>E. faecium</i>	2
Hematoloji	
<i>E. faecalis</i>	1
Kadın Hastalıkları	
<i>E. faecalis</i>	2
<i>E. faecium</i>	1
Kalp Damar Hastalıkları	
<i>E. faecalis</i>	3
<i>E. faecium</i>	1
Kardiyoloji	
<i>E. faecalis</i>	2
<i>E. faecium</i>	1
Kroner yoğun bakım	
<i>E. faecalis</i>	1
Medikal Onkoloji	
<i>E. faecalis</i>	1
<i>E. faecium</i>	3
Nefroloji	
<i>E. faecalis</i>	6
<i>E. faecium</i>	2
Nöroloji	
<i>E. faecalis</i>	3
Onkoloji	
<i>E. faecalis</i>	1
Ortopedi	
<i>E. faecalis</i>	1
Üroloji	
<i>E. faecalis</i>	22
<i>E. faecium</i>	2
Yeni Doğan	
<i>E. faecalis</i>	3
<i>E. faecium</i>	1
Genel Toplam	130

İzolatların kliniklere göre dağılımı yukarıdaki çizelgede verilmiştir.



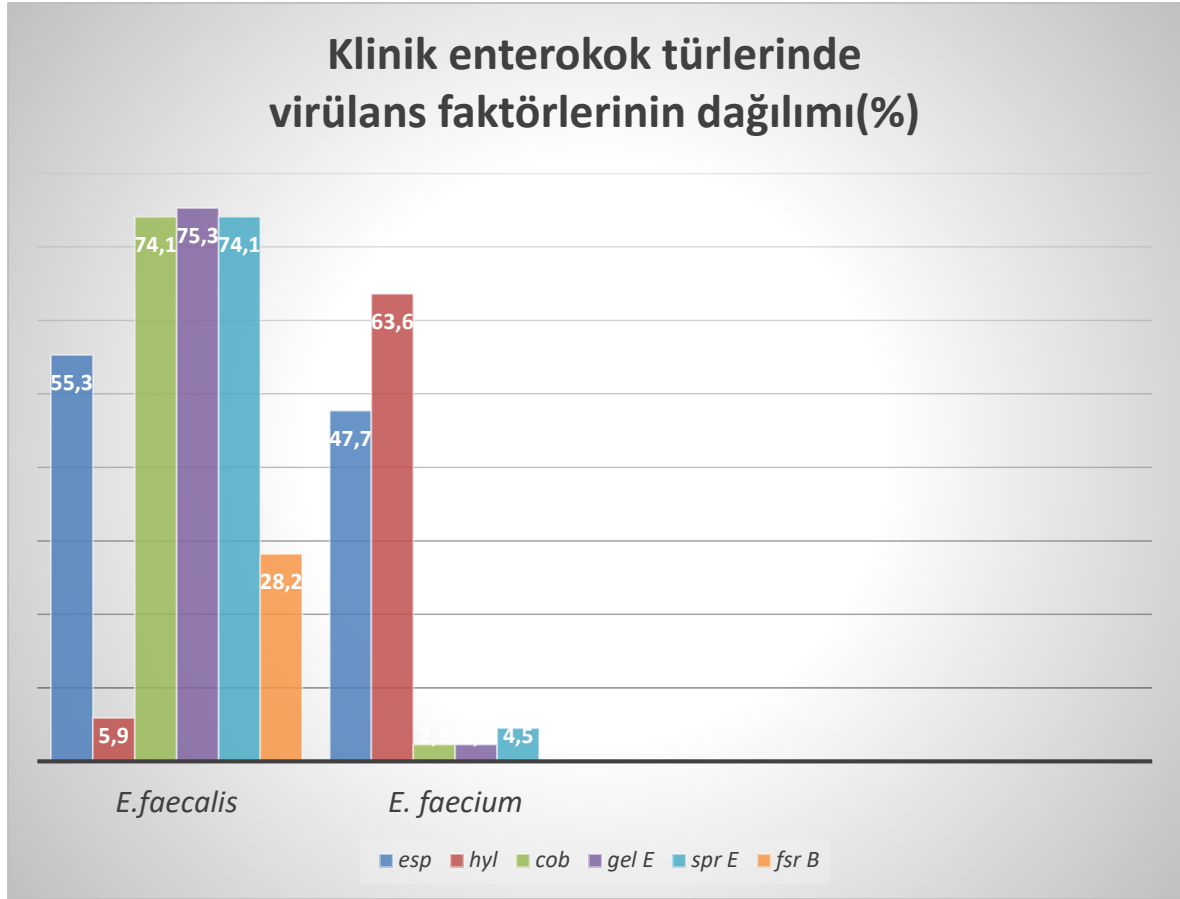
Şekil 4.3. Klinik materyale göre enterokok türlerinin dağılımı

130 izolatta *esp*, *hyl*, *cob*, *gelE*, *sprE* ve *fsrB* virülans faktörlerinin varlığı tespit edildi. 68 *esp*, 33 *hyl*, 64 *cob*, 65 *gelE*, 65 *sprE* ve 24 *fsrB* varlığı tespit edildi. *E. faecalis* izolatlarının % 55,3 *esp*, % 5,9 *hyl*, % 74,1 *cob*, % 75,3 *gelE*, % 74,1 *sprE* ve % 28,2 *fsrB* varlığı tespit edildi. *E. faecium* izolatlarının % 47,7 *esp*, % 63,6 *hyl*, % 2,3 *cob*, % 2,3 *gelE* ve % 4,5 *sprE* varlığı gözlemlendi. Klinik materyal çeşitine göre, virülans faktörlerinin dağılımı çizelge 4.2’de verildi.

Çizelge 4.2. Klinik materyal çeşitine göre virülans faktörlerinin dağılımı

Klinik materyal	Örnek sayısı	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	<i>cob</i>	<i>gelE</i>	<i>sprE</i>	<i>fsrB</i>
Kan							
<i>E. faecalis</i>	6	4	1	4	6	6	2
<i>E. faecium</i>	8	4	4	1	0	1	0
Toplam	14	8	5	5	6	7	2
İdrar							
<i>E. faecalis</i>	61	34	2	47	45	45	17
<i>E. faecium</i>	18	11	14	0	1	0	0
Toplam	79	45	16	47	46	45	17
Yara							
<i>E. faecalis</i>	11	5	2	7	7	7	3
<i>E. faecium</i>	6	2	2	0	0	0	0
Toplam	17	7	4	7	7	7	3
Periton S.							
<i>E. faecalis</i>	1	0	0	1	0	0	0
<i>E. faecium</i>	3	0	1	0	0	1	0
Toplam	5	0	1	1	0	1	0
Plevra S.							
<i>E. faecium</i>	5	3	4	0	0	0	0
Toplam	5	3	4	0	0	0	0
Abse K.							
<i>E. faecalis</i>	1	1	0	1	1	0	0
Toplam	1	1	0	1	1	0	0
BOS							
<i>E. faecalis</i>	1	0	0	0	1	1	1
Toplam	1	0	0	0	1	1	1
Diren							
<i>E. faecium</i>	2	0	1	0	0	0	0
Toplam	2	0	1	0	0	0	0
Doku							
<i>E. faecalis</i>	1	1	0	1	1	1	1
Toplam	1	1	0	1	1	1	1
Katater ucu							
<i>E. faecalis</i>	2	2	0	2	2	2	1
Toplam	2	2	0	2	2	2	1
Püy							
<i>E. faecalis</i>	1	0	0	0	1	1	0
Toplam	1	0	0	0	1	1	0
Safra							
<i>E. faecium</i>	2	1	2	0	0	0	0
Toplam	2	1	2	0	0	0	0
Toplam	130	68	33	64	65	65	24

Klinik materyal çeşitine göre virülans faktörlerinin dağılımı çizelge 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Klinik enterokok türlerine göre virülans faktörlerinin dağılımı (%)

Enterokok türlerinde CRISPR-ilişkili (cas) genlerinin dağılımı CRISPR1-cas *csn1*, CRISPR3-cas *csn1* genlerinin varlığına göre araştırıldı. Paralel olarak, CRISPR1-cas ve CRISPR3-cas lokuslarının yokluğu EF0672-0673 and EF1760-1759 bağlantı bölgelerinin (junction) saptanmasıyla belirlendi. CRISPR2 lokusu korunmuş pozisyonu hedefleyen primerler tarafından tespit edildi.

CRISPR2 en yüksek frekanslı CRISPR elementi olarak belirlendi. İncelenen 130 klinik enterokok izolatının 8'inde CRISPR1-cas, 73'ünde CRISPR2 ve sadece 1 izolatta CRISPR 3-cas varlığı tespit edildi.

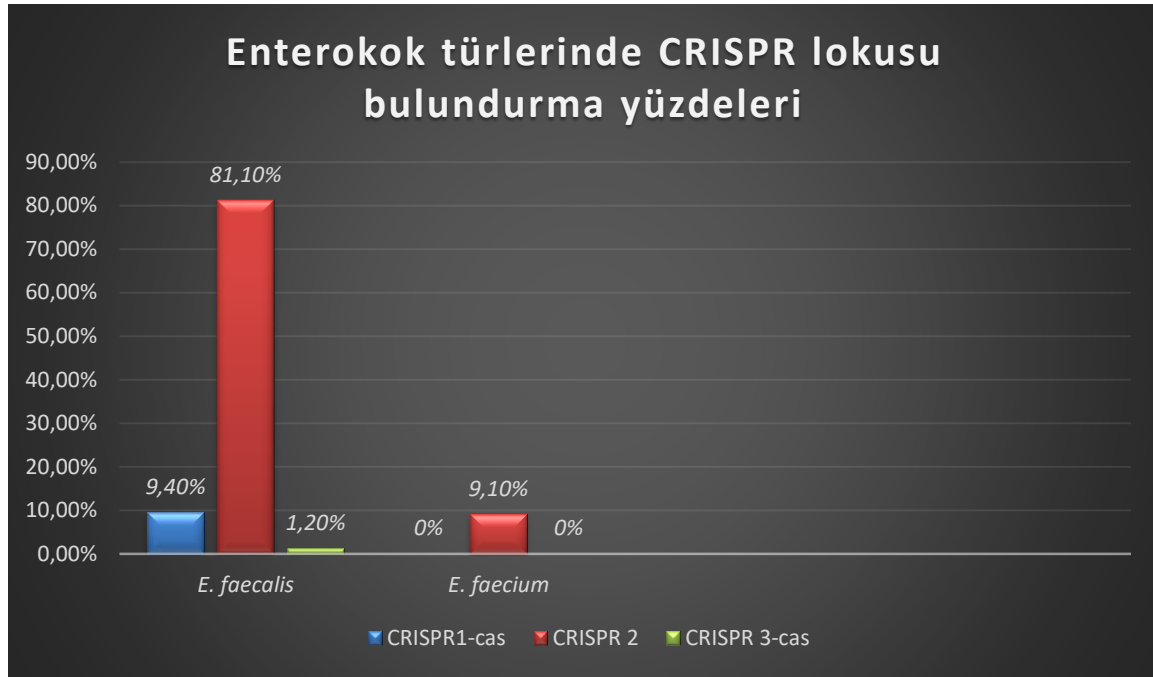
85 *E. faecalis* türünde 8 izolatta CRISPR1-cas, 69 izolatta CRISPR 2 ve 1 izolatta CRISPR 3-cas gen bölgesi görüldü. *E. faecium*'da ise sadece 4 izolatta CRISPR 2 lokusu gözlemlendi. Klinik material çeşidine göre CRISPR lokuslarının dağılımı çizelge 4.3'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. CRISPR-cas sistemlerinin klinik materyallere göre dağılımı

Klinik materyal	Örnek sayısı	CRISPR1-cas	CRISPR2	CRISPR3-cas
Kan				
<i>E. faecalis</i>	6	1	5	0
<i>E. faecium</i>	8	0	2	0
Toplam	14	1	7	0
İdrar				
<i>E. faecalis</i>	61	5	50	0
<i>E. faecium</i>	18	0	1	0
Toplam	79	5	51	0
Yara				
<i>E. faecalis</i>	11	0	10	0
<i>E. faecium</i>	6	0	1	0
Toplam	17	0	11	0
Periton S.				
<i>E. faecalis</i>	1	0	0	0
<i>E. faecium</i>	3	0	0	0
Toplam	5	0	0	0
Plevra S.				
<i>E. faecium</i>	5	0	0	0
Toplam	5	0	0	0
Abse K.				
<i>E. faecalis</i>	1	0	1	0
Toplam	1	0	1	0
BOS				
<i>E. faecalis</i>	1	0	0	1
Toplam	1	0	0	1
Diren				
<i>E. faecium</i>	2	0	0	0
Toplam	2	0	0	0
Doku				
<i>E. faecalis</i>	1	1	1	0
Toplam	1	1	1	0
Katater ucu				
<i>E. faecalis</i>	2	1	2	0
Toplam	2	1	2	0
Püy				
<i>E. faecalis</i>	1	0	0	0
Toplam	1	0	0	0
Safra				
<i>E. faecium</i>	2	0	0	0
Toplam	2	0	0	0
Toplam	130	8	73	1

Enterococcus faecalis izolatlarının %9,4'ünde CRISPR1-cas, %81,1'inde CRISPR2, %1,2'sinde CRISPR3-cas varlığı gözlemlendi. *Enterococcus faecium*'da ise CRISPR 1-cas ve CRISPR3-cas lokusları belirlenmedi, sadece %9,1 oranında CRISPR2 lokusunun varlığı tespit edildi.

İzole edilen klinik enterokok türlerinin CRISPR elementlerini bulundurma yüzdeleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Enterokok türlerinin CRISPR lokusu bulundurma yüzdeleri

Enterokok türleri ile *esp*, *hyl*, *cob*, *gel E*, *sprE*, *fsrB*, CRISPR 1-cas, CRISPR 2 ve CRISPR 3-cas bulundurmaları arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını belirlemek üzere Pearson Ki Kare analizi ile p değerleri hesaplandı. $p < 0,05$ ise ilgili gen bölgesi ve enterokok türleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu gösterdi. Virulans gen bölgeleri ve CRISPR elementlerinin p değerleri çizelge 4.4'de belirtilmiştir.

5. TARTIŞMA

Enterokoklar nazokomiyal enfeksiyonların en önemli sebeplerinden biridir. Enterokok enfeksiyonlarının ve özellikle hastanede, çoklu-ilaca dirençli suşların artışı, enterokokların patojenezinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesini gerektirmektedir.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinden toplanan 130 klinik enterokok izolatında *esp*, *hyl*, *cob*, *gelE*, *sprE* ve *fsrB* virülans genleri ve CRISPR-ilişkili (*cas*) genleri CRISPR1-*cas csn1* ve CRISPR3-*cas csn1* genlerinin varlığı gösterilerek belirlendi. Paralel olarak CRISPR1-*cas*, CRISPR2, CRISPR3-*cas* lokuslarının dağılımı tespit edildi. Enterokoklardaki CRISPR *cas* gen/ lokusları ve virülans faktörleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırıldı.

Enterokoklarda patojenite oluşturan faktörler henüz kesin olarak tanımlanamamıştır. Çeşitli genlerin katkısı ile enterokok virülansının multifaktöriyel bir işlem olabileceği düşünülmektedir [59]. Plazmid ve transpozonların yanısıra çoğalma ve aktarım için gerekli genler bakterilere uygun olmayan ortamlarda, hayatta kalmalarını sağlayan gerekli özellikleri kazandırır [99]. Bu tür özellikler arasında antibiyotik veya ağır metal direnci, bakteriyosin aktivitesi, alışılmamış substratların metabolize edilmesi ve virülans faktörleri yer alır. Virülans faktörleri çoğunlukla konjugatif plazmidlerde bulunur. Bu belirleyiciler, gastrointestinal sistem gibi doğal bir ortamda, suşlara yatay olarak yayılma kolaylığı sağlar ve muhtemelen adaptif ve patojenik özelliklerin potansiyel olarak daha az virülan endojen floraya yayılma hızını etkiler. Bu nedenle, doğal olarak oluşan gen değişim mekanizmaları temel olarak virülansın bir ifadesidir.

Enterokoklar konakçıya tutunduktan sonra, dokuda yayılımları sırasında kolonize oldukları yerlerden besin kaynaklarının sınırlı olduğu ve fagositik lökositlerin bulunduğu farklı bir çevre ile karşılaşılır. Bu durumda, enterokoklar yeni çevre koşullarında çoğalmalarını sağlayan genleri ve konakçının inflamatuvar yanıtlarının modülasyonunda etkili faktörleri ifade etmeye başlar. Bu faktörler enterokokların konakçı hücrelere ve hücre dışı matrikse yapışmasını, doku invazyonu ve immünomodülasyonu kolaylaştırarak toksin aracılığı ile doku hasarı oluşturmalarına neden olur.

Enterokok virölansı, genomda bulunan patojenite adaları [PAI] olarak adlandırılan özel bölgelerdeki virölans kodlayıcı genlerce düzenlenmektedir. PAI transpozaz, transkripsiyonu düzenleyen ve virölans potansiyel rolleri bilinen proteinleri kodlayan genleri bulundurur. *E. faecalis*'in PAI'sı enterokok yüzey proteini, sitolizin ve agregasyon gibi virölans özelliklerini kodlar [100].

Çeşitli araştırmalar enterokok virölansının *esp*, *gelE*, *ace*, *ccf*, *cyll*, *cpd*, *agg*, *cob* ve *efaA* gibi çeşitli virölans faktörleriyle ilişkisini göstermiştir [101]. Bu çalışma *esp*, *hyl*, *gelE*, *cob*, *sprE*, *fsrB* virölans genlerinin dağılımını PZR yöntemiyle belirlemiş ve enterokok türleri arasında farklılıklar olduğunu tespit etmiştir.

Tartışmalı virölans belirleyicilerinden biri *E. faecalis* ve *E. faecium*'un patojenite adalarındaki *esp* geninin kodladığı enterokokal yüzey proteinidir [102]. *Esp*, biyofilm oluşumu ve kolonizasyon potansiyelinin artışından sorumlu olan virölans genidir [56]. Bir çok araştırma *esp* geni ile biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğunu göstermiştir [103, 104]. Hastanelerdeki bazı vankomisine dirençli *E. faecium* klonlarında *esp* bulunma oranının yüksek olması, virölans sürecinde *esp* geninin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir [105].

Klinik izolatlar arasında *esp*'yi kodlayan genin sıklığı kommensal izolatlardan daha yüksektir [56]. Bu bulgu, hastalık veya patogeneze sürecinde enterokokların hastanede hayatta kalmalarında rolü olan patojenite adalarındaki açık okuma çerçevelerinin (ORÇ) kommensal türevli enterokoklarda bulunmamasından kaynaklı olabileceğini ifade etmektedir [100]. Araştırmamızda 130 izolatın 68'inde (%52.3) tespit edilen *esp* geninin en yaygın virölans determinantı olduğu belirlendi. Buna paralel olarak, birçok çalışma en yaygın virölans faktörünün *esp* olduğunu tespit etmiştir [59,60, 106]. Shankar ve diğerleri. *esp* gen sıklığını kan kültürlerinde (% 29) ve feçesde (% 3) düşük frekansta saptamışlardır [56].

Bu çalışma tür düzeyinde değerlendirildiğinde; *E. faecalis* (% 55,3) ve *E. faecium*'da (%47,7) yüksek oranda *esp* gen sıklığı belirlendi. *E. faecium*'da yüksek oranda görülen *esp* sıklığı bir çok araştırma ile benzerlik göstermektedir [59, 60, 106-107]. Enterokok türleri ve *esp* varlığı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($P>0.05$). Aksine, Charles Franz ve arkadaşları *E. faecium*'da düşük sıklıkta (% 2.1) *esp* varlığı belirlemişlerdir [106]. *E. faecium*

izolatlarında sadece *esp* geni belirleyen bazı çalışmalar mevcuttur [57]. Aksine, bu çalışma *E. faecium* türünde; *esp* geninden başka düşük frekansta *sprE*, *gelE*, *hyl* ve *cob* virülans genlerinin varlığını da belirlemiştir.

Esp'nin özellikle *E. faecalis* suşunun üriner sistem epiteline tutunması ve kalıcı olarak kolonize olmasında etkin bir faktör olduğu düşünülmektedir [56]. Gridhara ve diğerleri., *esp* geninin idrar yolu enfeksiyonlarında kalıcılığı arttırdığını belirtmişlerdir [108]. Bu çalışmada da *esp* bulunduran izolatların % 66.2'si (68 örnekte 45 tanesi) idrardan izole edildi. Klinik *E. faecium* izolatlarındaki *esp* geninin varlığı ya da yokluğu ile biyofilm oluşumu arasında herhangi bir ilişki olmadığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır [105,109].

Sitolizin, feromon, lipoteikoik asit, jelatinaz ve hyaluronidaz gibi ürünlerin aktiviteleri enterokoklara patojenite özelliği kazandırır. Hidrolitik enzimlerden olan hyaluronidaz, jelatinaz ve serin proteazın rolleri henüz açıkça anlaşılmamış olsa da, enterokok türlerinin virülansı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [110]. Hyaluronidaz ve proteaz (veya jelatinaz) az çalışılan virülans faktörlerindendir [111]. Hyaluronidaz, hiyalüronik asite etki ederek doku hasarı oluşturur, böylece enterokokların konakçı dokusunda yayılımlarını kolaylaştırır ve bakterinin daha uzun süre hayatta kalmasına yardımcı olur [112].

Bu çalışma enterokok türlerinde hyaluronidaz enzimini kodlayan *hyl* gen sıklığını % 25,4 olarak tespit etti. Araştırmamızdaki *hyl* sıklığı Streteva ve diğerlerinin yaptığı araştırma bulguları ile uyumlu bulundu [113]. Bu çalışmada, tür düzeyinde *hyl* sıklığı kıyaslandığında; *E. faecium* izolatlarındaki *hyl* sıklığının (% 63,6), *E. faecalis* izolatlarının (% 5,9) sıklığından daha fazla olduğu belirlendi. Enterokok türleri ve *hyl* geni arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p<0,001$).

Enterokoklardaki jelatinaz proteini, jelatin, kollajen, kazein, hemogloblin ve diğer peptidleri hidroliz eden bir çinko metaloproteazdır [57, 114]. Jeletinazın insan enterokok enfeksiyonlarındaki rolü az bilinmesine rağmen, hayvanlarda *E. faecalis* virülansına katkısı gösterilmiştir [55]. 130 klinik enterokok izolatının %50'sinde *gelE* varlığı gösterildi. *E. faecalis*'de %75,3 ve *E. faecium*'da % 2,3 sıklığında *gelE* varlığı tespit edildi. Enterokok türleri ile *gelE* varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulundu ($P<0,001$). Strateva ve diğerleri *E. faecalis* izolatlarında %82.2 ve *E. faecium* izolatlarında %17.1 sıklıkta *gelE* geni tespit

etmişlerdir [106]. Aksine, birçok çalışma *E. faecium*'da *gelE* geni saptamamıştır [59, 55, 107, 110, 115]. Bu çalışmada *E. faecalis* izolatlarındaki *gelE* gen frekansının (%75,3) diğer çalışmalardaki gen frekanslarına benzerliği görülmüştür [57, 107, 113, 116,].

Serin proteazı kodlayan *sprE* geni ve *gelE* birlikte transkribe edilir [117]. *GelE* ve *sprE*'nin transkripsiyonu *fsr* operonu (fokal streptokok regülatörü) tarafından kodlanan yeterli çoğunluğu algılama sisteminin (QS) büyüme fazına bağlı bir şekilde düzenlenir [118]. Son çalışmalar bu lokusun çok sayıda genin ekspresyonundaki etkisinden dolayı önemli bir küresel regülatör olduğunu belirlemiştir [119].

Fsr operonu, *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC* genlerinden oluşur. *FsrA* geni monosistronik olarak bir yanıt regülatöründen ve proses enzimini kodlayan *fsrB* ve algılayıcı kinazı kodlayan *fsrC* ile birlikte kopyalanır [120]. *FsrB* jelatinaz biyosentezini aktive eden feromon (GBAP) peptidini açığa çıkarır. Bu çalışmada *fsrB* gen sıklığı % 19.2 olarak tespit edildi ve *fsrB* geni saptanan suşların % 95,8'inde *sprE* ve *gelE* genlerinin birlikte bulunduğu saptandı. Bu birliktelik her iki genin *fsr* operonu tarafından düzenlendiğini destekler niteliktedir. Diğer bir çalışma *E. faecalis*'te *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC* mutasyonlarının % 28-32 oranında biyofilm oluşumunu azalttığını göstermiştir [121]. *Fsr* operonunun varlığı 12 *E. faecalis* endokardit suşlarının tümünde belirlenirken 19 dışkı suşunun sadece 10'nunda gösterilmiştir. Bu bulgu *Fsr*'nin virülans ve hastalığındaki önemini göstermektedir [120].

Bakteride feromon salgılanmasını *cob* geni sağlar ve konjugasyonu kolaylaştırarak gen alışverişi olasılığını artırır. Bilindiği gibi direnç ve virülans genleri horizontal gen transferi (HGT) aracılığıyla yayılmaktadır. 2001'de yapılan bir çalışmada cinsiyet feromon elementleri sadece *E. faecalis* suşlarında tanımlanmış, *E. faecium* suşlarında ise seks feromonunun genotipik ifadesine rastlanmamıştır [59]. Bu çalışmada. özellikle *E. faecalis*'de yüksek oranda (% 74,1) *cob* geni tespit edildi. Aksine, *E. faecium* izolatlarının sadece birinde *cob* geni belirlendi ve iki tür arasında anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p < 0,001$).

Seks feromonları enterokokların virülansında ve antibiyotik direncinin yayılmasında etkili bir faktördür. Genomda bu faktörün varlığı, genetik materyal değişim yeteneklerinin göstergesi olabilir. Epidemiyolojik çalışmalar, seks feromonlarının sağlıklı kişilerden daha çok hastanede yatan hastaların dışkı örneklerinde, sıklıkla bakteriyemi ve yara enfeksiyonu olan hastalardan izole edildiğini göstermiştir [122].

Lindenstrauss ve diğerleri, frekansı en düşük virülans faktörünün *cob* olduğunu belirlemişlerdir. Aksine, bu çalışma *cob* sıklığını yüksek oranda (% 49,2) belirlemiş ve en düşük frekanslı virülans geninin *fsrB* (% 19,2) olduğunu saptamıştır [57].

CRISPR, bakteri ve arkelerde bakteriyofajlara karşı sekansa özgü bir savunma mekanizması kodlar ve horizontal gen transferine karşı bir bariyer oluşturur. Bir CRISPR dizisinin aralık dizileri, CRISPR interferansının hedeflerini belirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, CRISPR girişiminin bakteriyofaj enfeksiyonunu ve plazmid konjugasyonunu önlediğini göstermiştir [69].

Bakteriler CRISPR fonksiyonunu sık olmasa da kaybedebilir, kapsül genlerini alabilir ve enfeksiyon oluşturabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalardan biri CRISPR girişiminin in vivo virülans oluşumunu önleyebildiğini diğer çalışma ise CRISPR ve virülans özelliği arasında bir bağlantı olmadığını bildirmiştir [123]. Bakteriyel patojenlerde virülans veya antibiyotik direncinin CRISPR kaybına yol açabileceğini göstermiştir [112]. Aksine, virülansda CRISPR sisteminin kanıtlanan bir etkisi bulunmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [57].

Bu çalışmada CRISPR2'nin en sık görülen lokus (%56,2) olduğu belirlendi. *E. faecalis*'de % 81,2 ve *E. faecium*'da %18,8 oranında CRISPR2 lokusunun varlığı görüldü ve türler arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p < 0,001$). CRISPR2 lokusunda *cas* benzeri fonksiyonel genlerin bulunmadığı bildirilmiştir [88, 98]. CRISPR2 ve antibiyotik direnç genlerinin bir arada bulunması CRISPR2'de fonksiyonel *cas* genlerinin olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu bulgu CRISPR2'nin tek başına bağışıklıkta etkin bir rol oynamadığını göstermiştir [98].

Önceki bir çalışmada, *E. faecalis* suşlarında CRISPR1-cas ve CRISPR3-cas varlığında farklılık ve *E. faecalis* suşlarının tümünde sadece CRISPR2 lokusunun varlığı belirlenmiştir [124]. CRISPR1-cas ve CRISPR2'nin direkt tekrar dizilerinin benzediği gösterilmiştir [125]. Cas proteinleri sentezlendikten sonra CRISPR tekrar dizileri ile etkileşime girmesi nedeniyle, CRISPR1-cas ve CRISPR2'nin fonksiyonel olarak bağlantılı olabileceği düşünülmektedir [98, 126].

Bu çalışmada, CRISPR-cas genlerinin dağılımına göre; *E. faecalis* suşlarında CRISPR3-cas *csn1* (% 1,2) varlığına kıyasla daha sık CRISPR1-cas *csn1* varlığı (% 9,4) tespit edilmiştir. Ayrıca % 81,2 sıklıkta CRISPR2 varlığı saptanmıştır. Aksine, *E. faecium* suşunda düşük sıklıkta CRISPR2 varlığı (% 9,1) belirlenmiştir.

Çeşitli çalışmalar CRISPR-cas ve antibiyotik-direnç genleri arasında ters yönlü bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir [93]. Diğer bir çalışmada *cob*, sitolizin operonu ve *as* varlığı ile *cas* genlerinin dağılımı arasında ters bir korelasyon tespit edilmiş, fakat *cas* genleri ve diğer virülans özelliklerini kodlayan genler arasında benzer bir ilişki saptanmamıştır [57]. *Cob*, sitolizin operonu ve *esp* aynı patajonite adasında bulunmasına rağmen *esp* ile *cas* genlerinin dağılımı arasında benzer bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum, *cob* varlığının CRISPR-cas savunma sisteminin genetik değişim yeteneğinin gelişmesini ve ilgili patojenite adasının veya bir kısmının kazanılmasını önleyici bir rolü olduğunu öne sürmektedir. Bu çalışmada *cob* determinantı ve CRISPR1-cas arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Bu korelasyon Lindestrausb ve ark.'nın araştırma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir [57].

Sonuç olarak *cob* dışında diğer virülans faktörleri ve CRISPR lokusları arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. *Cob* ve CRISPR1-cas genleri arasında negatif bir korelasyon olduğu görüldü. *Enenterokok* türleri ve 4 virülans faktörü (*hyl*, *cob*, *sprE*, *fsrB*) arasında anlamlı bir ilişki saptandı. Bu araştırma sonuçlarının enterokokların sebep olduğu hastalıklarla mücadelede fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Murray, B. E. (1990). The Life and Times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 46–65.
2. Koneman, E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger PC, Winn W.C. (1992). Enterococcus species. In: Koneman EW (ed.) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. (4. Baskı). Philadelphia: Lippincott Company, 440-446.
3. Schleifer, K. H. & Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the Genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 31–34.
4. Coque T. M., Tomayko J. F.(1996). Vancomycin resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40 (11), 9.
5. Karagöz, G. (2005) *Yoğun Bakım Ünitesinde Vankomisin Dirençli Enterokok Taşıyıcılığının araştırılması*, Uzmanlık Tezi, T. C. Sağlık Bakanlığı Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 10.
6. Başustaoğlu, A., Özyurt, M., Beyan, C., Altun, B., Aydoğan, H., Haznedaroğlu, T., Ünal, S., & Yalçın, A. (2000). Glikopeptid Dirençli Enterococcus faecium. *Flora*, 5(2), 142–147.
7. Yetkin, M.A., Ateş A.N.(2004). Vankomisine dirençli enterokok bakteremisi: Olgu sunumu. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*; 8 (4), 310-4.
8. Kaya, H. (2016) *Bazı Antiseptik Ve Dezenfektanların Vankomisin Dirençli Enterokoklar (VRE) Üzerine Etkilerinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, T.C. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van,4.
9. Fisher, K., Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, 155,1749-1757.
10. Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J. A. E., Kilpper-Balz, R., & Schleifer, K. H.(1984). Enterococcus avium nom. rev., comb. nov.; E. casseliflavus nom. rev., comb. nov.; E. durans nom. rev., comb. nov.; E. gallinarum comb. nov.; and E. malodoratus sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2), 220–223.

11. Švec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., & Swings, J. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 2183–2187.
12. De Vaux, A., Laguerre, G., Divies, C., & Prevost, H. (1998). *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *International journal of systematic bacteriology*, 48, 383–387.
13. Kadri, Z., Spitaels, F., Cnockaert, M., Praet, J., El Farricha, O., Swings, J., & Vandamme, P. (2015). *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 1257–1265.
14. Carvalho, M. da G. S., Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Sampson, A. J., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M., & Facklam, R. R. (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1505–1508.
15. Sukontasing, S., Tanasupawat, S., Moonmangmee, S., Lee, J. S., & Suzuki, K. I. (2007). *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2151–2154.
16. Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., Švec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., & Swings, J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2177–2182.
17. De Graef, E. M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M. D., Lefebvre, K., Swings, J., & Haesebrouck, F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1069–1074.
18. Devriese, L. A., Ceyssens, K., Rodrigues, U. M., & Collins, M. D. (1990). *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *Fems Microbiology Letters*, 71(3), 247–251.
19. Kim, J. Y., Shin, N. R., Na, H. K., Hyun, D. W., Whon, T. W., Kim, P. S., Yun, J. H., & Bae, J. W. (2013). *Enterococcus diestrammenae* sp. nov. isolated from the gut of *Diestrammena coreana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4540–4545.
20. Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Falsen, E., Moore, E., & Lawson, P. A. (2013). Two novel species *Enterococcus lemanii* sp. nov. and *Enterococcus eurekaensis* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103, 1409–1418.

21. Schleifer, K. H., & Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 31–34.
22. Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M. C., Ingianni, A., Cortis, G., & Dainelli, B. (1992). *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin., *International journal of systematic bacteriology*, 42(3), 365–369.
23. Tyrrell, G. J., Turnbull, L., Teixeira, L. M., Lefebvre, J., Carvalho, G. S., Richard, R., Lovgren, M., & Facklam, R. R. (2002). *Enterococcus gilvus* sp. nov. And *Enterococcus pallens* sp. nov. isolate from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), 1140–1145.
24. Law-Brown, J., & Meyers, P. R. (2003). *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov. a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 683–685.
25. Sistek, V., Maheux, A. F., Boissinot, M., Bernard, K. A., Cantin, P., Cleenwerck, I., de Vos, P., & Bergeron, M. G. (2012). *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. And *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(6), 1314–1320.
26. Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Espinola, M. M. B., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Brenner, D. J., & Facklam, R. R. (2001). *Enterococcus porcinus* sp. nov. And *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1737–1743.
27. Maarit Niemi, R., Ollinkangas, T., Paulin, L., Švec, P., Vandamme, P., Karkman, A., Kosina, M., & Lindström, K. (2012). *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9), 2169–2173.
28. Sedláček, I., Holochová, P., Mašlaňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., & Švec, P. (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 502–510.
29. Rodrigues, U., & Collins, M. D. (1990). Phylogenetic analysis of *Streptococcus 47 saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *Fems Microbiology Letters*, 71(1–2), 231–234.

30. Chen, Y. S., Lin, Y. H., Pan, S. F., Ji, S. H., Chang, Y. C., Yu, C. R., Liou, M. S., Wu, H. C., Ootoguro, M., Yanagida, F., Liao, C. C., Chiu, C. M., & Huang, B. Q. (2013). *Enterococcus saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* subsp. nov., isolated from broccoli. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 12), 4691–4697.
31. Vancanneyt, M., Zamfir, M., Devriese, L. A., Lefebvre, K., Engelbeen, K., Vandemeulebroecke, K., Amar, M., De Vuyst, L., Haesebrouck, F., & Swings, J. (2004). *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2175–2179.
32. Harada, T., Dang, V. C., Nguyen, D. P., Nguyen, T. A. D., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Motooka, D., Nakamura, S., Uchida, K., Jinnai, M., Yonogi, S., Kawahara, R., Kanki, M., Kawai, T., Kumeda, Y., & Yamamoto, Y. (2016). *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 3779–3785.
33. Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R., & Fryer, J. L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov. a Fish Pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 406–409.
34. Sedláček, I., Holochová, P., Mašlaňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., & Švec, P. (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 502–510.
35. Rahkila, R., Johansson, P., Säde, E., & Björkroth, J. (2011). Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1196–1203.
36. Li, C. Y., Tian, F., Zhao, Y. D., & Gu, C. T. (2014). *Enterococcus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 3), 1012–1017.
37. Miller, M. (1978). Cocci-shaped *Enterococcus* spp. bacteria taken from a pneumonia patient. *Public Health Image Library* (PHIL).
38. Hardie J.M., Whiley R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 83(1)-11.
39. Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P., Auffray, Y. (1996) Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2416–2420

40. Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.C., Auffray, Y. (1997) Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaption, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 812–814
41. Manero, A., Blanch, A. R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4425–4430.
42. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG.(2000) Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(686)-707.
43. Coyote, J., Hancock, L. E. (2002). Enterococcal cell wall. *American society for microbiology*, 10, 177-218.
44. Sansar Yıldırım, D. (2015). *Fekal klinik örneklerden soyutlanan enterokok kökenlerinin antibiyotik duyarlılığının saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Balıkesir, 4.
45. Cox, D., Wright, G.D.(2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287-292.
46. Galloway-Pena J. R, Nallapareddy S. R., Arias C. A., Eliopoulos G. M., Murray B. E., (2009) Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States, *The Journal of Infectious Diseases*, 200 (10),1566–1573,
47. Moellering R. C. (1991) The enterococcus: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 28 (1), 12.
48. Vural T, Şekercioğlu A. O., Ögünç D. (1999). Vankomisine dirençli *E. faecium* suşu. *Ankem Dergisi*; 13(1), 5
49. Brian L. Hollenbeck & Louis B. Rice (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus, *Virulence*, 3(5), 421-569
50. Bushby, S. R. M., & Hitchings, G. H. (1968). Trimethoprim, a Sulphonamide Potentiator, *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 33(1), 72–90.
51. Hiramatsu, K. (1998) Vancomycin resistance in Staphylococci, *Drug Resistance Updates*, 1 (2), 135-150

52. Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G. , Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 541–554
53. Çöleri, A., Çökmüş, C. (2008). Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 65 (2), 87-96
54. Arias, C., Martinez, M., Blundell, T. L., Arthur, M., Courvalin, P., & Reynolds, P. E. (1999). Characterization and modelling of VanT: a novel, membranebound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular Microbiology*, 31(6), 1653–64.
55. Elsner, H. A., Sobottka, I., Mack, D., Claussen, M., Laufs, R., Wirth R. (2000). Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19, 39-42
56. Shankar, N., Lockatell, C. V., Baghdayan, A. S., Drachenberg, C., Gilmore, M. S., Johnson, D. E. (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection, *Infection and Immunity*, 69, 4366–4372.
57. Lindenstrauß, A. G., Pavlovic, M., Bringmann, A., Behr, J., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011). Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 553– 560
58. Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B. (1994). Genetic structure of the *enterococcus faecalis* plasmid pad1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of Bacteriology*, 176 (23), 7335-7344
59. Eaton, T. J. , Gasson, M. J. (2000). Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(4), 1628–1635
60. Vankerckhoven, V., Autgaerden, T. V., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H. (2004). Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(10), 4473–4479
61. Rice L.B., Carias, L. , Rudin, S., Vael, C., Goossens, H., Konstabel, C. , Klare, I., Nallapareddy, S. R., Huang, W., Murray B. E.(2003). A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *The Journal of Infectious Diseases*; 187(3): 508-12.

62. Clewell, D. B., Francia, M. V., Flannagan, S. E., An, F. Y. (2002). Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid*. 48(3):193-201
63. Chandler, J. R., & Dunny, G. M. (2004). Enterococcal peptide sex pheromones: Synthesis and control of biological activity. *Peptides*, 25, 1377-1388.
64. Gümüş, N., Tezcanlı Kaymaz, B. (2018). Genom düzenlemede crisper/cas9 çağı ve lösemideki uygulamaları. *Kafkas journal of medical sciences*. 8(3), 232-248
65. Mojica, F.J.M., Villasenor, C.D., Soria, E., Juez, G. (2000) Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 36(1), 244-246
66. Jansen, R., Embden, J.D.A., Gaastra, W., Schouls, L. M. (2002) Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *A Journal of Integrative Biology*. 6(1), 1565–1575
67. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005;151(8):2551–61.
68. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–8
69. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*; 151(3), 653–63
70. Wilkinson, R., Wiedenheft, B. (2014) A CRISPR method for genome engineering. *F1000 Prime Reports*, 6(3), 6-3
71. Garneau, J. E., Dupuis, M., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA, *Nature*, 468(67)-71
72. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J., Charpentier E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(602), 7.
73. Sashital, D.G., Jinek, M., Doudna, J.A. (2011). An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3, *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(6), 680-7
74. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Zhan, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, 339(6121), 819-823

75. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. (2008). CRISPR a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 181-6
76. Al-Attar S, Westra ER, Van Der Oost J, Brouns SJJ.(2011) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): The hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes, *Journal of Biological Chemistry*; 392(4), 277–89
77. Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Dohmae, N., Shehata, S. I., Ishitani Karginov F V., Hannon GJ. (2010). The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea, *Molecular Cell*, 37(1), 7–19
78. Al-Attar S, Westra ER, Van Der Oost J, Brouns SJJ.(2011) Clustered regularly interspaced, R., Zhang, F., Nureki, O., (2014) Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA, *Molecular Cell*, 156, 935-949
79. Barrangou R., (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wires RNA*, 4(3), 267–78
80. Gün Gök, Z., Çağdaş Tunalı, B.(2016). CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları, *Uluslararası Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Dergisi*, 8(2), 11-23
81. Pul, Ü., Wurm, R., Arslan, Z., Geissen, R., Hofmann, N., Wagner, R.(2010). Identification and characterization of E. coli CRISPRCas promoters and their silencing by H-NS, *Molecular Microbiology*, 75(6):1495–512
82. Hale C.R., Majumdar S., Elmore J., Pfister N., Compton M., Olson S., (2012 Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs that Function with the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs, *Molecular Cell*, 45(3), 292–302.
83. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–12
84. Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., Lundgren, M.,(2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications, *Biochimie*, 117, 119-128
85. Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V., (2011) The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Research*, 39 (21), 9275-9282
86. Makarova, K.S.,Haft,D.H.,Barrangou, R.,Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S.(2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 467–477
87. Jiang, F., Doudna1, J. A.(2015). The Structural Biology of CRISPR-Cas Systems, *Current Opinion in Structural Biology*, 30, 100-111

88. Savić N, Schwank G.(2015) Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing, *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 168, 15-21
89. Barrangou R, Marraffini L.A.,(2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity, *Molecular Cell*, 54(2), 234-44.
90. Makarova, K. S., Koonin, E. V.(2018). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems, *Methods, Molecular Cell*, 1311, 47–75
91. Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R.M., Terns, M.P, (2008), Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes, *Genes & Development*, 22(3489), 96.
92. Clinical Laboratory Standards Institute 2011. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing*, Document M100-S21, CLSI, Wayne, 172
93. Palmer, K.L., Gilmore, M.S. (2010) Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *American society for Microbiology*, 1 (4), 10.
94. Eberhard, W. G. (1989). Why do bacterial plasmids carry some genes and not others? *Plasmid*, 21, 167-174
95. Hacker J, Kaper JB. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*, 54, 641-79
96. Chuang, O. N., Schlievert, P. M., Wells, C. L., Manias, D. A., and Tripp, T. J. (2009) Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infection Immunology*, 77, 539–548.
97. Leavis H, Top J, Shankar N. (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity, *Journal Bacteriology*; 186:672–682.
98. Soares, R.O., Fedi, A., C., Reiter, K., C., Caierão, J., & Azevedo, P., A., (2014) Correlation between biofilm formation and gelE, esp and agg genes in *Enterococcus* spp. Clinical isolates, *Journal*, 5(5), 634-637
99. Diani, M., Gunay Esiyok, O., Ariafar, M., N., Yuksel, F., N., Altuntas, E., G., Akcelik, N. (2013), The interactions between esp, fsr, gelE genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains, *African Journal of Microbiology Research*, 8(2), 129-137.
100. Willems R.J.L., Bonten M.J.M., (2007). Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20. 384-390
101. Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H. (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *Enterococci* isolated from food, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4385–4389.

102. Dupre`, S., Zanetti, A. M., Schito, G., Fadda L., Sechi, A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy), *Journal of Medical Microbiology*, 52, 491–498
103. Giridhara Upadhyaya P.M., Ravikumar K.L., Umapathy, B.L. (2009) Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 4(27), 301-305.
104. Raad, I.I., Hanna H.A., Boktour M., (2005). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, esp gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49, 5046-5050
105. Smedo T, Santos MA, Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Barreto Crespo MT, Tenreiro R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference *Enterococci*: a common trait in the genus?, *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 13–22.
106. Rosan, B., Williams, N. B. (1964). Hyaluronidase production by oral enterococci, *Archives of Oral Biology*, 151 (9), 291-298
107. Biswas, P.P., Dey, S., Adhikari L., Sen A. (2014) Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. *Journal Global Infection Diseases*, 6, 157–63
108. Strateva, T., Atanasova, D., Savov, E., Petrova, G., Mitova, I., (2015) Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20 (2), 127-133
109. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. (1992). Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells, *Infection and Immunity*, 60, 25-30
110. Coque, T. M., Willems, R. J., Fortún, J., Top, J., Diz, S., Loza, E., Cantón, R., Baquero, F. (2005). Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?, *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 49(7), 2693-700.
111. Baldisserotto, C., Resende, M. C. C., Caierão, J., d'Azevedo, P. A., (2013) Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin, *Journal*, 108 (5), 590-595,
112. De Fa´tima Silva Lopes, M., Simões, A. P., Tenreiro, R., Figueiredo Marques, J. J. & Barreto Crespo, M. T. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci, *International Journal of Food Microbiology*, 112, 208–214.
113. Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infection and Immunity*. 68, 2579–2586.

114. Bourgogne A., Hilsenbeck S.G., Dunny G.M., Murray B.E. (2006). Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease, *Journal Bacteriology*, 188, 2875–2884
115. Podbielski, A., Kreikemeyer, B., (2004). Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci, *International Journal of Infectious Diseases*, 8(2), 81-95
116. Jamal A. Mohamed, David B. Huang, (2007) Biofilm formation by enterococci, *Journal Of Medical Microbiology*, 56(12), 1581–1588
117. Wardal, E., Sadowy, E., & Hryniewicz, W. (2010). Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids, *Polish Journal of Microbiology*, 59, 79-87
118. Bikard, D., Aslan, A., H., Mucida, D., Marraffini, L., A. (2012) CRISPR Interference Can Prevent Natural Transformation and Virulence Acquisition during In Vivo Bacterial Infection, *Cell Host & Microbe*, 12(2), 177-186.
119. Hullahalli K., Rodrigues M., Schmidt B. D., Li X., Bhardwaj P., Palmer K. L. (2015). Comparative Analysis of the Orphan CRISPR2 Locus in 242 *Enterococcus faecalis* Strains, *Plos One* 10(9), 1-14
120. Bourgogne, A., Garsin, D. A., Qin, X., Singh, K., Sillanpaa, J., Yerrapragada, S., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Buhay, C., Shen H., Chen, G., Williams G., Muzny, D., Maadani, A., Fox, K. A., Gioia, J., Chen, L., Shang, Y., Arias, C. A., Nallapareddy, S. R., Zhao, M., Prakash, V. P , Chowdhury, S., Jiang, H., Gibbs, R. A., Murray, B. E., Highlander, S. K and. Weinstock. G. M, (2008). Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biology*, 9, 110
121. Brouns, S. J., M. M., Jore, M., Lundgren, E. R., Westra, R. J., Slijkhuis, A. P., Snijders, M. J., Dickman, K. S., Makarova, E. V., Koonin, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960 –964

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALBAYRAK, Derya
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 26.02.1990, Düzce
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 202 33 87
 Faks : 0 (312) 202 82 20
 e-mail : deryagokce.4@gmail.com



Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Devam Ediyor.
Lisans	Hacettepe Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Düzce Arsal Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi, Yıl	Yer	Görev
2016-devam ediyor	Milli Eğitim Bakanlığı	Öğretmen
2014-2016	Altis Klinik Araştırma	Klinik Araştırma Uzmanı
2013-2014	Düzen Laboratuvar Grubu	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Futbol, Yüzme, Dans, Tüplü dalış, Bisiklete binme.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

