



**POTANSİYEL PROBİYOTİK ADAYI ENTEROCOCCUS FAECIUM
BAKTERİLERİNİN GÜVENLİĞİ**

Nur Seda AHLATCI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2019

Nur Seda AHLATCI tarafından hazırlanan “POTANSİYEL PROBİYOTİK ADAYI ENTEROCOCCUS FAECIUM BAKTERİLERİNİN GÜVENLİĞİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan: Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

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

.....

Üye: Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ

Biyoteknoloji ve Nanoteknoloji Ana Bilim Dalı, Aksaray Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 13/12/2019

Jüri tarafından kabul edilen bu çalışmanın Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen 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.

Nur Seda AHLATCI
13/12/2019

POTANSİYEL PROBİYOTİK ADAYI ENTEROCOCCUS FAECIUM BAKTERİLERİNİN GÜVENLİĞİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Nur Seda AHLATCI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2019

ÖZET

Çevresel bir epidemiyolojiye sahip olan *Enterococcus faecium* suşları, insanlarda nozokomiyal enfeksiyonlarda çok önemli bir problem olarak görülmelerinden dolayı probiyotik olarak önerilebilmeleri için virülans ve direnç genleri içermemeleri gerekmektedir. Tez çalışmasında Türkiye ve İran' ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden izole edilen toplam 20 *Enterococcus faecium* suşlarının probiyotik olarak kullanılabilme güvenilirliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, bakterilerin disk difüzyon yöntemiyle 10 antibiyotiğe duyarlılıkları, jelatinaz ve sitolizin üretim yetenekleri ve biyofilm oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. Ayrıca, vankomisin direnç genleri (*van A* ve *van B*) ve virülans faktörlere (*gelE*, *cylA*, *cylB*, *esp*, *agg* ve *asa1*, *efaAfm*, *cob*, *ccf*, *hyl*) ait genler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmış ve genlerin varlığı sekans analizi ile doğrulanmıştır. Son olarak vankomisin direnç ve virülans genlerin plazmid aracılığı ile aktarılabilme olasılığından dolayı bakterilerin plazmid DNA'ları araştırılmıştır. Bakterilerin disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik duyarlılıkları sonucunda vankomisin, penisilin-G, ampisilin, kloramfenikol'e %100 duyarlı, gentamisin ve polimiksin B antibiyotiklerine %100 dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra tetrasiklin'e %95, eritromisin'e %61 duyarlı, ofloksasin'e %81 ve rifampisin'e %52 dirençli olduğu görülmüştür. Fenotipik olarak suşların hiçbirisinde jelatinaz, hemolitik aktiviteye bağlı β hemoliz ve biyofilm yapısı gözlenmemiştir. Bakterilerde direnç genlerini bulundurma oranı *van A* geninde %5, *van B* geninde %60 olarak tespit edilmiştir. Virülans genler ise *efaAfm* %95, *cob* %85, *ccf* %45, *gelE* %40, *asa1* %20, *esp* %20, *hyl* %10 ve *agg* %5 olarak belirlenmiştir. Suşların hiçbirisinde *cob* ve *ccf* genlerine ve plazmid varlığına rastlanmamıştır. Enterokokların probiyotik olarak önerilebilmeleri için virülans genlere sahip olup olmadığının belirlenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Enterokok, probiyotik, virulans
Sayfa Adedi : 103
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

THE SAFETY OF POTENTIAL PROBIOTIC ENTEROCOCCUS FAECIUM
BACTERIA

(M. Sc. Thesis)

Nur Seda AHLATCI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2019

ABSTRACT

Enterococcus faecium strains, which have an environmental epidemiology, should not contain virulence and resistance genes in order to be probiotic as they are seen as a very important problem in human nosocomial infections. In this thesis, it is aimed to determine the reliability of 20 *Enterococcus faecium* strains isolated from feta produced in different regions where Turkey and Iran can be used as probiotics. For this purpose, the susceptibility of bacteria to 10 antibiotics by disc diffusion method, the production capabilities of gelatinase and cytolysin and their ability to form biofilms were determined. In addition, vancomycin resistance genes (*van A* and *van B*) and virulence factors (*gelE*, *cylA*, *cylB*, *esp*, *agg* and *asa1*, *efaAfm*, *cob*, *ccf*, *hyl*) genes were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) and the presence of genes sequence analysis. Finally, plasmid DNAs of bacteria were investigated due to the possibility of vancomycin resistance and virulence genes to be transferred by plasmid. As a result of antibiotic susceptibility determined by disc diffusion method, bacteria were found to be 100% sensitive to vancomycin, penicillin-G, ampicillin, chloramphenicol and 100% resistant to gentamicin and polymyxin B antibiotics. In addition, it was found to be 95% sensitive to tetracycline, 61% sensitive to erythromycin, 81% resistant to ofloxacin and 52% resistant to rifampicin. Phenotypically, none of the strains showed gelatinase, β hemolysis and biofilm structure due to hemolytic activity. Resistance genes were found to be 5% in the *van A* gene and 60% in the *van B* gene bacteria. Virulence genes were determined 95%, *cob* 85%, *ccf* 45%, *gelE* 40%, *asa1* 20%, *esp* 20%, *hyl* 10% and *agg* 5%. *Cob* and *ccf* genes and plasmids were not detected in any of the strains. It is necessary to determine whether there are virulence genes for enterococci to be recommended as probiotics. .

Science Code : 20309

Key Words : Enterococcus, probiotic, virulence

Page Number : 103

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her konuda desteğini, anlayışını ve engin bilgilerini esirmeyen, bana yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a minnettarlığımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte kıymetli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Derya ÖNAL DARILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel aşamalarda bana pek çok konuda destek olan Biyoteknoloji Anabilim Dalı asistanları, doktora ve yüksek lisans öğrencileri ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma, ayrıca deneyisel çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Aksaray üniversitesi yüksek lisans öğrencisi Orhan ORUÇ ve Orhan ÇETİN'E teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her konuda yanımda olan sevgili aileme, yardımları ve dostluklarıyla manevini desteğini esirgemeyen arkadaşım Hande KAYALAK'a ve kuzenim İlknur KOÇYİĞİT'e teşekkür ederim

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2017-18 kodlu araştırma projesi ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğüne teşekkür ederiz. |

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. <i>Enterococcus faecium</i> Bakterisinin Genel Özellikleri	5
2.2. <i>Enterococcus faecium</i> ve Probiyotik.....	5
2.3. <i>Enterococcus faecium</i> Şuşlarının Patogenezi ve Virülans Faktörleri	7
2.3.1. Antibiyotik direnci	8
2.3.2. Jelatinaz.....	10
2.3.3. Sitolizin/Hemolizin	11
2.3.4. Enterokokkal yüzey proteini	12
2.3.5. Agregasyon maddesi	12
2.3.6. Enterokokkal antijen A	13
2.3.7. Seks feromon determinantı	13
2.3.8. Hiyaluronidaz	13
2.4. Biyofilm	14
2.5. Enterokoklarda Plazmid DNA.....	15

	Sayfa
2.6. Enterokokların Güvenilirliği.....	16
2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	16
3. MATERYAL VE METOT.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Test bakterileri	18
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri	18
3.1.3. Bakterilerin geliştirilmesi ve muhafazası	19
3.2. Metot	19
3.2.1. <i>E. faecium</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi.....	19
3.2.2. Jelatin hidroliz testi	20
3.2.3. <i>E. faecium</i> suşlarının hemolizin aktivitelerinin belirlenmesi	21
3.2.4. Biyofilm oluşumunun mikropate yöntemi ile belirlenmesi	21
3.2.5. <i>E. faecium</i> suşlarının PZR ile vankomisin direnç ve virülans gen bölgelerinin belirlenmesi	23
3.2.6. DNA dizi analizi	29
3.2.7. <i>E. faecium</i> suşlarında plazmid DNA izolasyonu	29
3.2.8. İstatistiksel analiz.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. <i>E. faecium</i> Suşlarının Antibiyogram Sonuçları	33
4.2. <i>E. faecium</i> Suşlarının Jelatin Hidroliz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	36
4.3. <i>E. faecium</i> Suşlarının Hemolizin Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	36
4.4. <i>E. faecium</i> Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	38
4.5. Vankomisin Direnç Genlerinin Belirlenmesi (<i>vanA</i> ve <i>vanB</i>) ve Jel Elektroforez görüntüleri.....	40
4.6. Virülans Genlerinin Belirlenmesi ve Jel Elektroforez Görüntüleri.....	42

	Sayfa
4.6.1. Jelatinaz (<i>gelE</i>) gen bölgesi.....	42
4.6.2. Sitolizin (<i>cylA</i> ve <i>cylB</i>) gen bölgesi.....	44
4.6.3. Enterokokkal yüzey proteini (<i>esp</i>) gen bölgesi.....	45
4.6.4. Hücre agregasyon ve konjugasyon (<i>agg</i>) ile agregasyon faktörü (<i>asa1</i>) gen bölgeleri.....	47
4.6.5. Enterokokkal yüzey antijeni A (<i>efaAfm</i>) gen bölgesi	48
4.6.6. Seks feromon determinantı (<i>cob</i> , <i>ccf</i>) gen bölgeleri.....	50
4.6.7. Hiyaluronidaz (<i>hyl</i>) gen bölgesi	52
4.7. DNA Dizi Analizi.....	55
4.8. Plazmid DNA İzolasyonu	58
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR	75
EKLER.....	93
EK-1. <i>E. faecium</i> strain LAC7.2 chromosome, complete genome (<i>vanA</i>)	94
EK-2. <i>E. faecium</i> NRRL B-2354, complete genome (<i>vanB</i>)	95
EK-3. <i>E. faecalis</i> strain MD4 gelatinase (<i>gelE</i>) gene, partial cds (<i>gelE</i>).....	96
EK-4. <i>E. faecalis</i> strain LD33, complete genome (<i>esp</i>).....	97
EK-5. <i>E. faecalis</i> strain CK135 plasmid pPD1, complete sequence (<i>asa1</i>).....	98
EK-6. <i>E. faecium</i> strain 515 chromosome, complete genome (<i>efaAfm</i>)	99
EK-7. <i>E. faecium</i> strain N56454 chromosome, complete genome (<i>cob</i>).....	100
EK-8. <i>E. faecium</i> strain V2937 chromosome, complete genome (<i>ccf</i>)	101
EK-9. <i>E. faecium</i> strain DMEA02 chromosome, complete genome (<i>hyl</i>).....	102
ÖZGEÇMİŞ	103

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suşlar ve izolasyon kaynağı	17
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan MRS besiyerinin içeriği.....	18
Çizelge 3.3. Test edilen antibiyotikler, kısaltmaları, doz içerikleri, antibiyotik grupları ve etkinlik dozları	20
Çizelge 3.4. Araştırmada kullanılan primerler	24
Çizelge 3.5. <i>Vana</i> ve <i>vanB</i> gen bölgesine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	25
Çizelge 3.6. <i>VANA</i> ve <i>vanB</i> gen bölgelerinin PZR reaksiyonu	25
Çizelge 3.7. <i>EfaAfm</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>cylA</i> , <i>cylB</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> gen bölgelerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	26
Çizelge 3.8. <i>Efaafm</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>cylA</i> , <i>cylB</i> , <i>cob</i> , <i>ccf</i> gen bölgelerinin PZR reaksiyonu ..	26
Çizelge 3.9. <i>Asa1</i> ve <i>hyl</i> gen bölgelerine ait ısıl döngü ve süre diyagramı	26
Çizelge 3.10. <i>Asa1</i> ve <i>hyl</i> gen bölgelerinin PZR reaksiyonu.....	27
Çizelge 4.1. <i>E. faecium</i> suşlarının antibiyogram sonuçları ve ÇAD indeksi	35
Çizelge 4.2. <i>E. faecium</i> suşlarının hemoliz sonuçları	38
Çizelge 4.3. <i>E. faecium</i> suşlarında biyofilm oluşumu.....	39
Çizelge 4.4. Vankomisin direnç genleri ile ilgili PZR sonuçları.....	41
Çizelge 4.5. Jelatinaz (<i>gelE</i>) geni PZR sonuçları.....	43
Çizelge 4.6. Sitolizin (<i>cylA</i> ve <i>cylB</i>) gen bölgeleri PZR sonuçları.....	44
Çizelge 4.7. Enterokokkal yüzey proteini (<i>esp</i>) gen bölgesi PZR sonuçları.....	46
Çizelge 4.8. Hücre agregasyon ve konjugasyon (<i>agg</i> ve <i>asa1</i>) gen bölgeleri PZR sonuçları	47
Çizelge 4.9. Enterokokkal yüzey antijeni A (<i>efaAfm</i>) gen bölgesi PZR sonuçları	49
Çizelge 4.10. Seks feromon determinantı (<i>cob</i> , <i>ccf</i>) gen bölgeleri PZR sonuçları	51
Çizelge 4.11. Hiyaluronidaz (<i>hyl</i>) gen bölgesi PZR sonuçları.....	53

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.12. <i>E. faecium</i> suşlarının taşıdıkları direnç ve virülans genler	55
Çizelge 4.13. DNA dizi analizi BLAST sonuçları.....	56

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Genomik DNA'nın moleküler büyüklükleri.....	27
Şekil 4.1. <i>E. faecium</i> suşlarının antibiyotik % duyarlılıkları	35
Şekil 4.2. <i>E. faecium</i> suşlarının yüzde hemolitik aktiviteleri	37
Şekil 4.3. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>vanA</i> geni amplifikasyonu.....	41
Şekil 4.4. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>vanB</i> geni amplifikasyonu.....	42
Şekil 4.5. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>gelE</i> geni amplifikasyonu.....	43
Şekil 4.6. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>cylA</i> geni amplifikasyonu.....	45
Şekil 4.7. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>cylB</i> geni amplifikasyonu.....	45
Şekil 4.8. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>esp</i> geni amplifikasyonu.....	46
Şekil 4.9. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>agg</i> geni amplifikasyonu.....	48
Şekil 4.10. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>asa1</i> geni amplifikasyonu	48
Şekil 4.11. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>efaAfm</i> geni amplifikasyonu.....	50
Şekil 4.12. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>cob</i> geni amplifikasyonu	51
Şekil 4.13. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>ccf</i> geni amplifikasyonu	52
Şekil 4.14. <i>E. faecium</i> suşlarının <i>hyl</i> geni amplifikasyonu	53
Şekil 4.15. <i>E. faecium</i> suşlarının virülans gen bölgeleri yüzde dağılımı	54
Şekil 4.16. <i>E. faecium</i> suşlarında plazmid DNA jel görüntüsü	58

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. <i>E. faecium</i> RI-79 (a) ofloksasin (1) ve rifampisin (2), <i>E. faecium</i> RT-101 (b) vankomisin (1) ve gentamisin (2) antibiyotiklerine duyarlılığı.....	34
Resim 4.2. <i>E. faecium</i> RI-74 suşunun penisilin (1), tetrasiklin (2), eritromisin (3) ve Kloromfenikol (4) antibiyotiklerine karşı duyarlılığı	34
Resim 4.3. <i>E. faecium</i> suşlarının jelatin hidroliz aktivitesi.....	36
Resim 4.4. <i>E. faecium</i> suşlarının sitolizin aktivitesi	37
Resim 4.5. Enterokok suşlarının mikropate de üreme aşaması	39
Resim 4.6. Enterokok suşlarının PBS ile yıkama aşaması.....	40
Resim 4.7. Enterokok suşlarının Kristal Viyole ile boyanma aşaması	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
bç	Baz çifti
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pH	Asitlik bazlık birimi
rpm	Dakikada devir sayısı
sp	Species (türleri)
Tm	Erime sıcaklığı
β	Beta

Kısaltmalar

Açıklamalar

ATCC	American Type Cultur Collection (Amerikan Kültür Koleksiyonu)
CLSI	Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
EfaA	Enterokokal antijen a
EPS	Ekzopolisakkarit
Esp	Enterokokal yüzey proteini

Kısaltmalar**Açıklamalar**

fsr	Fekal streptokok regülatör
GRAS	Genel olarak güvenli bilinen
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Mono potasyum fosfat
LAB	Laktik asit bakterisi
MgCl₂	Magnezyum klorür
MRS	Man rogosa sharpe
Na₂HPO₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NB	Nutrient broth
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tampon tuz çözeltisi
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
TAE	Tris asetat edta
TSB	Triptik soy broth

1. GİRİŞ

Enterokoklar, insan gastrointestinal sisteminin (GIT) normal mikrobiyolojik popülasyonunun bileşenleridir. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* ve *Enterococcus hirae* türleri tipik olarak insan gastrointestinal sistemiyle ilişkili görünmektedir (Švec ve Franz, 2014; Holzapfel ve ark., 2018). Enterokok türleri, çevrede geniş çapta yayılırlar ve insanlarda ve birçok hayvanda gastrointestinal kanalda kolonileşmeye olanak sağlarlar (Arias ve Murray, 2012). Ayrıca enterokoklar, çeşitli çevresel koşullarda gelişebilen ve memelilerin sindirim kanallarında, havada, suda, atık suda, toprakta ve bitki örtüsü üzerinde bol miktarda bulunabilen bakteri türüdür (Gardin ve ark., 2001; Sadowsky ve Whitman, 2011). Bu ortamların yanı sıra enterokoklar et, süt ürünleri ve bitkisel yiyecekler de dâhil olmak üzere birçok çeşitli gıdada da bulunurlar (Omar ve ark., 2004; Tatsing Foka ve Ateba, 2019).

Enterococcus faecium, çeşitli fermente gıda ürünlerinin üretiminde yararlı bir rol oynar ve bu ürünlerin olgunlaşmasına ve aromasına katkıda bulunur. *Enterococcus* cinsinin farklı türlerine ait çok sayıda suş, proteolitik, lipolitik, esterolitik ve diğer enzimatik aktiviteler, sitrat kullanımı ve bakteriyosin üretimi (Giraffa, 1995; Sarantinopoulos ve ark., 2001; Foulquié Moreno ve ark., 2006) gibi birçok ilginç biyokimyasal ve biyoteknolojik özellik gösterebilir. Neticede gıda fermentasyonlarında veya probiyotik olarak kullanılmak üzere uygun suşlar olarak seçilebilirler. Enterokoklar tarafından üretilen laktik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler (enterosinler) gibi antimikrobiyal maddeler gıda bozucu veya patojenik bakterilere karşı gıda maddelerinin raf ömrünü uzatmak ve hijyen güvenliğini artırmak için kullanılabilirler (Hugas ve ark., 2003; Leroy, Foulquié Moreno ve Vuyst, 2003; Fracalanza ve ark., 2007; Belgacem, 2010).

Enterococcus faecium ve *Enterococcus faecalis* gibi bazı enterokok türleri laktik asit bakterisinin bir türü olarak insan ve çiftlik hayvanlarında probiyotik olarak kullanımları bildirilmiştir (Liu, 2013; Li ve ark., 2019). Probiyotik yem katkıları, konakçılara olumlu etkileri nedeniyle antibiyotiklere alternatif olarak önerilmektedir (Liu ve ark. 2014; Yu ve ark., 2017; Abhisingha ve ark., 2018). *Enterococcus faecium*, yemde probiyotik takviyesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Önceki çalışmalar probiyotik *E. faecium*'un bağırsak mikrobiotası arasında dengeyi koruyabildiğini (Thacker, 2013), besin maddelerinin

emilimini desteklediğini (Wang ve ark., 2014), konakçı bağışıklık sistemini geliştirebildiğini (Sun ve ark., 2010; Kim ve ark., 2010), ishal ve büyüme performansı üzerine yararlı bir etkisi olduğunu kanıtlamıştır ve antibiyotiklerin yerine *E. faecium* kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Zeyner ve Boldt, 2006; Bednorz ve ark., 2013; Wang ve ark., 2016; Lan ve Kim., 2017; Chengjun Hu ve ark., 2019; Li ve ark., 2019).

E. faecium suşlarının probiyotik aktiviteleri sayesinde insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Natarajan ve Parani, 2015). *E. faecium* T-110, insan, hayvan ve su ürünleri kullanımı için geniş ölçüde reçete edilen probiyotik gıda ve yem katkı maddesi olan BIO-THREER dahil olmak üzere birçok probiyotik üründe bulunmaktadır ve *E. faecium* L-3 suşu, probiyotik Laminolakta ticari ürününde ana organizmadır (Karaseva ve ark., 2016; Aziz ve ark., 2019). Bununla birlikte, bu probiyotik özelliklere rağmen, enterokok, dünya çapında görülen hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenleri arasında yer alan, çoklu dirençli patojenlerden biri olarak da bilinmektedir (Sydnor ve Perl, 2011; Jahan ve ark., 2015). Ayrıca, enterokokların transfer edilebilir antibiyotik direnç genlerine sahip olmaları, probiyotik olarak kullanımında bazı kaygılar oluştursa da, *E. faecium* suşlarında herhangi bir probiyotik kaynaklı enterokokkal enfeksiyon bildirilmemiştir ve 20 yıldan uzun süredir kullanılmaktadır (Collins ve ark., 1998; Salminen ve ark., 2003; Franz ve ark., 2011; Bilginer ve Çetin, 2019).

Avrupa ülkelerinde insan probiyotikleri olarak kullanılan enterokok bakterilerinin çoğunda *E. faecium* bazılarında ise *Enterococcus faecalis*' den yararlanılmaktadır. Son yıllarda, nozokomiyal sistem enfeksiyonlarında enterokokların en yaygın ikinci neden olmalarından (Emanini ve ark., 2016) dolayı gıda kaynaklı ve probiyotik özellik gösterebilen probiyotik olarak önerilebilmeleri için virülans genlere sahip olup olmadıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu tezde daha önce probiyotik özellikleri başka bir tezde (Hajikhani, 2011) belirlenmiş 20 *E. faecium* suşlarının potansiyel probiyotik aday olarak önerilebilmesi için virülans determinantlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda;

- 1- Probiyotik özellikleri belirlenen 20 *E. faecium* suşunun etki mekanizmaları birbirinden farklı ve sağlık sektöründe yaygın olarak kullanılan 10 antibiyotiğe karşı duyarlılıklarının ve çoklu antibiyotik direnç indekslerinin belirlenmesi,
- 2- β - hemoliz aktivitesi enterokokların patojen olma ihtimalini arttırdığı için, suşların hemolizin aktivitesinin belirlenmesi,

- 3- Biyofilm oluşumunun ilk adımlarında gerekli olan jelatinaz, enterokok patogenezinde rol oynayan önemli bir virülans belirleyici olduğu için, suşların fenotipik olarak jelatinaz aktivitesinin ortaya konulması,
- 4- Endüstriyel korozyon ve biyo-kirlenme, kronik ve hastane enfeksiyonlarına kadar birçok alanda ciddi problemlere neden olan ve enterokokların önemli bir virülans özelliği olarak düşünüldüğünden bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespit edilmesi,
- 5- Günümüzde enterokokların probiyotik olarak kullanımları halen tartışma konusudur. Enterokokların vankomisin direnç genlerinin (*VanA*, *VanB*) ve virülans direnç genlerinin (agregasyon faktörü, enterokokkal antijen A, jelatinaz, enterokokkal yüzey proteini, seks feromon determinantı, sitolizin ve hiyaluronidaz) taranması,
- 6- Bakterilerde tespit edilen virülans genler ile fenotipik özellikler arasında bir ilişki olup olmadığının irdelenmesi,
- 7- Enterokokların virülanslığında, plazmid DNA' larda kodlanan virülans genlerde rol oynadığından, bakterilerin plazmid DNA' larının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Enterococcus faecium* Bakterisinin Genel Özellikleri

E. faecium kısa zincirler olarak ya tek başlarına ya da dizili çiftler halinde bulunan aurotolerant Gram-pozitif ve spor içermeyen koklardır. Enterokoklar başlangıçta D grubu streptokok olarak sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırma, Lancefield tarafından oluşturulan şemaya dayanmaktadır. 1984 yılında, DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları neticesinde enterokokların streptokoklarla daha uzak bir ilişki içinde olduğu görülmüş ve enterokoklara resmi cins statüsü verilmiştir (Schleifer ve Kilpper-Balz, 1984; Javed ve ark., 2011). Bugüne kadar 40 dan fazla *Enterococcus* türü tanımlanmış ve yaygın bir bakteri grubudur (Yuen ve Ausubel, 2014; Yin ve ark., 2018; Li ve ark., 2018). Bu türlerden biri *Enterococcus faecium*' dur.

E. faecium türlerinin çoğu pH 9,6'da, % 6,5 NaCl, % 40 safra tuzları varlığında gelişebilirler ve 60°C'de 30 dakika hayatta kalabilirler. *E. faecium* türleri 10 ila 45°C arasındaki sıcaklıklarda da gelişebilir (Moellering, 1992; Flahaut ve ark., 1996; Schleifer ve Kilpper-Balz, 1987; Devriese ve Pot, 1995; Javed ve ark., 2011; Hollenbeck ve Rice, 2012). Enterokokların genom büyüklüğü 2000-3500 kb arasında değişmektedir. Sitokrom enziminden yoksun oldukları için katalaz negatiftirler (Teixeira ve ark., 2012).

2.2. *Enterococcus faecium* ve Probiyotik

Probiyotikler, yerleşik gastrointestinal biyotanın özelliklerini geliştirerek, yeterli miktarda tüketildiğinde hayvan veya insan sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı veya mikro organizmaların tek veya karma kültürleridir (Howarth ve Wang, 2013; Cavalheiro ve ark., 2019). Ayrıca araştırmalar probiyotiklerin gıdaya eklenmesinin, serum kolesterol seviyesinin azaltılması, gelişmiş gastrointestinal fonksiyon, gelişmiş bağışıklık sistemi ve kolon kanseri riskinin düşük olması dahil olmak üzere birçok sağlık yararı sağladığını göstermiştir (Howarth ve Wang, 2013). Probiyotik kültürlerin çoğu bağırsak kökenlidir ve *Bifidobacterium* ile *Lactobacillus* cinsine aittir, enterokok suşları ise nadiren potansiyel probiyotik olarak kullanılmaktadır. İntestinal biyotanın probiyotik bakteri tüketimiyle desteklenmesinin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri vardır. Probiyotikler, birçok diyare

hastalığı türünün tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmıştır. Probiyotikler, ülseratif kolit, Crohn hastalığı ve Pouchitis gibi enflamatuvar barsak hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Probiyotik ayrıca laktoz intoleransı sorunları olan hastalar için de faydalıdır. Bir organizmanın probiyotik olarak kabul edilebilmesi için bazı zorunlu kriterler vardır. Buna göre bir probiyotik mikroorganizmada aranan özellikler;

1. Hastalıklara karşı direnci artırarak konakçı hayvan üzerinde yararlı bir etki yaratabilmeli,
2. İnsan kaynaklı olmalı,
3. Aşırı hücre canlılığına sahip olması gerekli,
4. Patojenik ve toksik olmamalı,
5. İmmün modülatör aktivitesine etkileşimde bulunabilecek veya sinyal gönderebilecek kadar olmalı,
6. Yerel metabolik aktiviteyi etkileme yeteneğine sahip olmalı,
7. Düşük pH ve organik asitlere direnç gibi bağırsak koşullarında hayatta kalmak ve işlemek için uygun olmalı,
8. Depolama ve saha koşullarında uzun süre uygulanabilir kalmak için kararlı, güvenli ve etkili olmalı,
9. Geri yükleme gücüne sahip olmalı ve bağırsak mikrobiotasını değiştirmeli,
10. Kanserojen ve anti-mutajenik aktiviteye, kolesterol düşürücü etkilere sahip olmalı, mukozal bütünlüğü koruyabilmeli ve bağırsak hareketliliğini artırabilmeli,
11. Gastrik sulara karşı dirençli olmaları ve oral uygulama için çok önemli görünen safra asidine maruz kalmaları gerekli,
12. Patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite göstermeli,
13. Safra tuzu hidrolaz aktivitesi olmalı,
14. Bağırsak mikrobiotasının ve patojenik olmama durumunun dengelenmesi,
15. Düşük pH'da ve safra ile temasta gastrointestinal sistemden geçerken hayatta kalmalıdır (Tewari ve ark., 2019).

Laktik asit bakteri (LAB) grubuna ait olan *E. faecium* türleri, insanların ve hayvanların gastrointestinal kanalında bulunan yerleşik mikrobiotanın büyük bir bölümünü oluşturan, toprakta, yüzey sularında, atık ve kentsel (arıtılmış) sularda, bitkilerde bulunan mikroorganizmalardır. Aynı zamanda bazı gıda ürünlerinde bulunabilirler. *Enterococcus faecium*, uzun süreli güvenli tüketime sahip fermente süt, fermente sebzeler, peynir ve sosisi de kapsayan çeşitli fermente gıdalarda baskındır (Hugas ve ark., 2003; Klein, 2003).

E. faecium suşlarının yüksek seviyede bakteriosin üretmesi ve insanlarda enterokoklarla ilgili olan enfeksiyonların %80'inde *E. faecalis* suşlarının tanımlanması sonucunda *E. faecium* suşları gıda uygulamalarında probiyotik amaçlı olarak en sık kullanılan türdür (Vael and Goossens, 2002; Gürsoy ve Kınık, 2006).

E. faecium PR88 suşunun insanlarda kolitis semptomlarını azalttığı ve probiyotik olarak faydalanılabildiği belirtilmektedir (Gürsoy ve Kınık, 2006). *E. faecium* K77 Danimarka'da ticari olarak bulunan ve starter kültür olarak kullanım için önerilen bir probiyotiktir (Ross ve ark., 2002; Gürsoy ve Kınık, 2006). Peynirlerin geleneksel mikrobiotasında bulunan enterokokların da çeşitli probiyotik etkileri görülebilmektedir. Saavedra ve ark. (2003) ev yapımı bir Arjantin peyniri olan Tafi peynirinden 122 *E. faecium* suşu izole etmişlerdir. 122 *E. faecium* suşundan 9 suşun kolesterol düşürücü özelliği olduğu, 6 suşun bakteriosin üretme kabiliyetinde olduğu ve probiyotik olarak kullanılabilecek bu suşların hiçbir virülans özelliği olmadığını bildirmişlerdir (Gürsoy ve Kınık, 2006).

Enterokoklar, potansiyel probiyotik adayları olarak giderek daha fazla araştırılmaktadır. *Enterococcus* cinsine ait, *E. faecium* SF68® (NCIMB 10415, Cerbios-Pharma SA, Barbengo, İsviçre) suşu probiyotik olarak tanımlanmıştır. *E. faecium* SF68®, hem farmasötik hem de hayvansal beslenme uygulamalarında probiyotik olarak kullanılmaktadır. SF68, 1979'da İsviçre'den başlayarak ve farklı ülkelerdeki sağlık otoriteleri tarafından farmasötik bir probiyotik olarak onaylanmıştır ve *E. faecium* NCIMB 10415 adı altında, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından çeşitli hayvan kategorileri için "bağırsak mikrobiotası stabilizatörü" olarak SF68 onaylanmıştır (<http://tinyurl.com/ycbyu35p>), (Holzapfel ve ark., 2018). Bybee ve ark (2011) tarafından yapılan çalışmalarda *E. faecium* SF68 R'nin evcil hayvanlarda ishalin önlenmesi ve tedavi edilmesi için probiyotik potansiyelini kanıtlamışlardır (Franz ve ark., 2011; Zommiti ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda *Enterococcus durans* M4-5 (kısa zincirli yağ asitleri üretimi), *Enterococcus faecium* M74 ve *Enterococcus durans* (serumdaki kolesterol seviyelerinin düşürülmesi), *Enterococcus mundtii* ST4SA (bakteriyosin üretimi), *Enterococcus faecium* LCW 44 ve *Enterococcus durans* 6HL (Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal bileşiklerin üretimi) gibi birçok enterokok suşu, gıda sistemlerindeki teknolojik uygulama veya sağlık fonksiyonu için faydalı olarak tanımlanmıştır (Hanchi ve ark., 2018; Nascimento ve ark., 2019).

2.3. *E. faecium* suşlarının Patogenezi ve Virülans Faktörleri

Özellikle klinik örneklerden izole edilen *E. faecium* nozokomiyal enfeksiyona neden olan en önemli patojenlerden biridir; idrar yolu, dolaşım sistemi, endokardiyum, karın ve pelvis, cilt ve cilt yapısı, nadiren merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere insan vücudunun birçok

bölümünü enfekte edebilir (Hammerum ve ark., 2017). *Enterococcus* cinsi birçok antimikrobiyal ajana doğal olarak dirençlidir (Cattoir ve Leclercq, 2013; Mutters ve ark., 2013). Son yıllarda, antibakteriyel ilaçların yaygın olarak kullanılması ve invazif operasyon tekniklerinin kullanılması, çoklu ilaca dirençli *Enterococcus*'un giderek artmasına yol açmakta ve böylece vankomisin *Enterococcus* enfeksiyonunun tedavisinde önemli bir rol oynamasına neden olmaktadır (Yang ve ark., 2019). Bununla birlikte, vankomisine dirençli enterokokların (VRE) ortaya çıkması tedavi zorluğunu arttırmaktadır (Bourdon ve ark., 2011).

Enfeksiyonların patogenezi, kolonizasyon, konakçı hücrelerine yapışma, dokuları istila etme ve spesifik olmayan savunma mekanizmalarına direnç gibi olayların bir dizisini içerir (Upadhyaya, Ravikumar ve Umapathy, 2009). Enterokoklar, konakçılarının dokularına yapışma yeteneğine sahiptir (Tomita ve Ike, 2004). Yapışma, düşük pH'a ve yüksek konsantrasyonlarda safra tuzlarına (Foulquie Moreno, Sarantinopoulos, Tsakalidou ve De Vuyst, 2006) dirençleri nedeniyle kolonu kolonize eden bakterilerin en yaygınları arasında enterokoklar bulunmaktadır. Kolonileşmenin kendisi tek başına patojenliğin kanıtı değildir, fakat diğer virülans faktörleri ve potansiyel olarak zararlı bir dizi direnç geninin varlığı kolonileşmeye neden olabilir. Kolonizasyonu teşvik eden virülans faktörleri şunlardır: agregasyon maddesi (*agg*, *asa1*), hücre duvarı adezini (*EfaA*), enterokokal yüzey proteini (*Esp*), (Hollenbeck ve Rice, 2012; Strzelecki, Sadowy ve Hryniewicz, 2011). Kolonizasyon işleminden sonra *Enterococcus* spp. konağın dokuları üzerinde yıkıcı etkiye sahip toksik maddeler salgılar. Enterokoklar tarafından salgılanan virülans faktörleri şunları içerir: sitolizin (*cyl*), jelatinaz (*gelE*) ve hiyaluridaz (*hyl*) (Chajęcka ve ark, 2017). Ayrıca seks feromon determinantları da (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*) enterokoklarda bulunan virülans faktörlerdendir. Virülans faktörlerinin tespiti, gıda izolatlarındaki virülans potansiyelini göstermesine rağmen, gıda kaynaklı enterokok enfeksiyonları hiç bildirilmemiştir. Bununla birlikte, antibiyotiğe dirençli bakteri popülasyonları taşıyan gıdaların tüketimi olası bir transfer yolu olarak ifade edilmektedir (Chajęcka ve ark., 2016).

2.3.1. Antibiyotik direnci

Bakteriler antibiyotiklere karşı interensek (doğal) direnç ve eksterensek (kazanılmış) direnç olmak üzere iki farklı direnç gösterirler. Antibiyotiğin tesir edeceği bölgenin bakteride bulunmaması türe özgü doğal direnç geliştirmektedir (Sharma ve ark., 2014) ve interensek

direnç dikey gen transferi ile sadece ana hücreden yavru hücreye geçmektedir. Kazanılmış direnç geni ise bakteriye mutasyon, konjugasyon, transdüksiyon veya translasyon yollarından herhangi biri ile aktarılması (yatay gen transferi) olarak ifade edilmektedir. Eksterensek direnç ana hücreden yavru hücreye geçebildiği gibi farklı türdeki bakteriler arasında da iletilebilir. Kazanılmış direncin türler arasında aktarılabilmesi, antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına ve bu genlerin probiyotik bakterilerin yanısıra patojen bakterilere de aktarılabildiği yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (Courvalin, 2006; Gevers ve ark., 2003; Madhavan ve Sowmiya, 2011; Meral ve Korukluoğlu, 2014). Demirgül ve Tuncer (2017) yaptıkları çalışmada fermente gıdalardan izole edilen 60 enterokok izolatının 44'ünün *E. faecium*, 7 *E. faecalis*, 5 *E. hirae*, 2 *E. durans*, 1 *E. mundtii* ve 1 *E. thailandicus* olduğunu bildirmişlerdir. Suşların çoğunun rifampisine (% 51,67), ardından siprofloksasin (% 38,33) ve eritromisine (% 21,67) dirençli olduğunu bildirmişlerdir. İzolatların tümü sadece ampisiline duyarlı, sadece *E. faecium* FYE4 ve FYE60 suşları tüm antibiyotiklere duyarlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hammad ve ark, (2015) peynirden izole ettikleri 120 enterokok suşunun antimikrobiyal duyarlılığının eritromisin (% 40), gentamisin (düşük seviye) (% 55), kloramfenikol (% 1,6), vankomisin (% 5), ve tetrasiklin (% 65) dirençli olduğunu ve enterokokal izolatların hiç birisinin ampisiline direnç göstermediğini bildirmişlerdir. *E. faecium* türü sefalosporinlere, linkosamitlere, penisilinlere ve düşük aminoglikozit seviyelerine karşı dirençleri nedeniyle halk sağlığı sorunu temsil edebilir (Hammad ve ark., 2015).

Vankomisin direnç genleri

Gram pozitif bakterilerde etkili olan glikopeptitler hücre duvarı sentezini inhibe ederler (Shepard ve Gilmore, 2002). Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sıkça rastlanan vankomisin direnci, glikopeptid direncine örnek verilebilir (Courvalin, 2006). Vankomisin direnci, özellikle endişe vericidir, çünkü hastanelerde vankomisine dirençli enterokokların (VRE) ortaya çıkması, konvansiyel antibiyotik tedavisi ile tedavi edilemeyen ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır. Enterokoklarda glikopeptid direncine aracılık eden sekiz farklı gen dizisi tanımlanmıştır: *vanC*, enterokokların intirinsik bir özelliği iken, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* özellikleri sonradan kazandığı bilinmektedir (Courvalin, 2006 ; Kristich ve ark., 2014). *vanA* tipi enterokok glikopeptid direnci en önemlisidir ve ana rezervuarı *E. faecium*'dur (Klare ve ark., 2003). Genellikle yüksek vankomisin direnci ile ilişkilidir ($MIC \geq 128 \mu g / mL$). Van A tipi fenotipi gösteren türlerin

çoğu, aynı zamanda teikoplanine de dirençlidir ($MIC \geq 8 \mu g / mL$). Bu direnç türü glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin) ve basitrasın, polimiksin B gibi diğer farklı antibiyotikler tarafından indüklenir. *vanB* elementlerinin çoğu, vankomisine ($MIC, 4-1000 \mu g/mL$) değişken direnç gösterir ancak bu antibiyotik indükleyici olarak hareket edemediğinden, suşların çoğu, *in vitro* olarak teikoplanine duyarlı kalır. Genel olarak, gıda kaynaklı VRE (vankomisine dirençli enterokok), tıbbi kökenli VRE izolatlarından daha düşük bir virülans faktörü oranına sahiptir. Gıda kaynaklı *Enterococcus*'un henüz doğrudan klinik enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmemiştir. Ayrıca, herhangi bir probiyotik kökenli enterokok enfeksiyonu bildirilmemiştir. Gıda endüstrisinde kullanılacak *Enterococcus* türlerinin seçiminde, türlerin patojenik özellikler ve antibiyotik direnç genleri taşımadığından emin olmak önemlidir (Erginkaya ve ark., 2007; Yerlikaya ve Akbulut, 2019).

2.3.2. Jelatinaz

Jelatinaz, molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa olan hücre dışı, çinkoya bağlı bir metaloenkepeptidazdır. Bu enzim jelatin, elastin, kollajen, hemoglobinin yanı sıra diğer biyoaktif peptidleri, örneğin; feromonlara bağlı proteinleri hidrolize edebilme yeteneğindedir (Archimbaud ve ark., 2002). Jelatinaz, kromozomda bulunan *gelE* geniyle kodlanır. Gen, üç genden oluşan lokus *fsr* (*fsrA*, *fsrB*, *fsrC*) ile düzenlenen transmembran proteinini *fsrB* tarafından kontrol edilir (Hancock ve Perego, 2004; Pillai ve ark., 2004). *fsrABC* genleri, düzenleyici protein *fsrA*, feromon taşıyıcı *fsrB* (GBAP) ve histidin kinaz *fsrC*'yi kodlamaktadır (Podbielski ve Kreikemeyer, 2004). Lokus *fsr* içindeki delesyonlar-*gelE* genine sahip olmasına rağmen - jelatinaz üretmeyen, virülansı azaltan mutantlar üretir. *fsrA*, *fsrB* veya *fsrC* genlerindeki mutasyonların biyofilm sentezini % 28-32 oranında azalttığı gösterilmiştir (Mohamed ve Huang, 2007). *gelE* geni, quorum sensing (çevreyi algılama) sisteminde düzenlenerek elatinaz biyosentezi aktivasyon feromonunun (GBAB) uygun seviyesine bağlıdır (Pinkston ve ark., 2011; Teixeira ve ark., 2012). Enterokoklardaki lokus *fsr*, *Staphylococcus aureus*'taki lokus *agr* ile işlevsel olarak benzerdir (Dunman ve ark., 2001). *gelE* geninin varlığı, hem klinik suşlarda hem de gıdadan izole edilen enterokoklarda test edilen virülansın belirleyicilerinden biridir. Genellikle *E. faecalis*'te ve *E. faecium* 'un bireysel suşlarında ortaya çıkmaktadır (Eaton ve Gasson, 2001).

2.3.3. Sitolizin/Hemolizin

Sitolizin, en iyi karakterize edilmiş enterokok virölans faktörlerinden biridir. Gram negatif bakterilere yönelik bakteriyosidal özellikler gösteren ve eritrositlere, lökositlere ve makrofajlara karşı toksik özellikler (β - hemoliz) gösteren bakteriyosin tipi bir ekzotoksindir (De Vuyst ve ark., 2003). Sitolizin üretimi, *cylR1*, *cylR2*, *cylL1*, *cylLs*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *cylI* olmak üzere sekiz gen içeren operonun sorumluluğundadır. Operon, güçlü bir şekilde korunmuş feromona bağlı konjugatif plazmidler (örneğin, pAD1) üzerine veya virölansın diğer determinantlarının (yüzey proteini *esp* ve agregasyon maddesi *agg*, *asa1*) yakınındaki bakteri kromozomundaki patojenite adasının içine yerleşmiş olabilir (Eaton ve Gasson, 2001; Shankar, Coburn, Pillar, Haas ve Gilmore, 2004).

Sitolizin ekspresyonu, *cylM* geni tarafından kodlanan, bir protein tarafından translasyon sonrası modifikasyona tabi tutulan, yapısal alt birimlerini kodlayan *cylL1* ve *cylLs* genleri tarafından kodlanmış en az beş protein gerektirir. Bir hücrede üretilen sitolizin, *cylM* geni tarafından kodlanan bir protein yardımı ile dışarıda salgılanır. Hücrenin dışında, sitolisin, *cylA* geni tarafından kodlanan serin proteaz tarafından aktive edilir ve hücrenin kendisi, sitolisin direncini etkileyen, *cylI* geni tarafından kodlanan bir yüzey proteini tarafından korunur. Sitolisin ekspresyonu, *cylR1* ve *cylR2* genlerini içeren bir düzenleyici sistem tarafından düzenlenir. Düzenleyici sistem, quorum sensing mekanizması tarafından, hücre dışındaki küçük sitolisin *cylL* alt biriminin konsantrasyonunun yeterince yüksek olduğu durumlarda aktive edilir (Hällgren ve ark., 2009; Semedo ve ark., 2003). Sitolizin kodlayan genler, hem enfeksiyonlardan izole edilen *Enterococcus* suşlarında hem de kommensal mikrobiyota oluşturanlarda bulunmuştur. Hem hayvansal hem de bitki kökenli, hayvanlardan ve gıda ürünlerinden izole edilen suşlarda sıkça meydana geldiklerini gösteren çok sayıda rapor vardır (Eaton ve Gasson, 2001; Ben Omar ve ark., 2004; Franz ve ark., 2001; Trivedi, Cupakova ve Karpiskova, 2011). Sitolizin kodlayan genler, enterokoklarda aşağıdaki türlerde bulunmuştur: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* ve *E. raffinosus* (Semedo ve ark., 2003a).

2.3.4. Enterokokkal yüzey proteini

Yaklaşık 200 kDa moleküler ağırlığa sahip olan Enterokokkal yüzey proteini (esp), tanımlanan en büyük enterokok proteinidir. Bu proteini kodlayan *esp* geni, aynı zamanda antibiyotiklerin hücre dışına atılmasından sorumlu proteinleri içeren patojenik adada (PAI) bulunur (Leavis ve ark., 2004). Bu konum muhtemelen *E. faecalis* ve *E. faecium* arasındaki yatay gen transferinin bir sonucudur. Esp proteini çalışmaları, hücreler arasındaki genetik materyal alışverişinde önemli bir rol oynayabilecek ve antibiyotiklere direncini artırabilecek biyofilm oluşumuna katıldığını doğrulamıştır (Donlan ve Costerton, 2002; Foulquie Moreno ve ark., 2006; Latasa, Solano, Penade ve Lasa, 2006). *E. faecium*'da *esp* geninin oluşumunun ampicilin, siprofloksasin ve imipenem direnci ile korele olduğu gösterilmiştir (Billstrom, Lund, Sullivan. Nord, 2008). Klinik suşların çalışmaları, *E. faecium*'un vankomisine dirençli suşlarının (VREF) % 83,3'ünün *esp* genine sahip olduğunu göstermiştir (Ochoa ve ark., 2013). Dahası , bu genlerin çoğu, Billstrom ve ark., (2008) tarafından test edilen çoklu ilaç direncini göstermiştir. *Esp* geninin, *E. faecium* suşları arasında plazmid konjugasyonu yoluyla ve ayrıca *E. faecalis*' in suşları arasında, kromozom-kromozom transpozisyonu ile transfer edilebileceği de gösterilmiştir (Oancea, Klare, Witte ve Werner, 2004).

2.3.5. Agregasyon maddesi

Agregasyon maddesi (*asa1*, *agg*) tanımlanan ilk enterokok yüzey proteinidir. Çoğunlukla virülans faktörü olarak hareket ettiğinden ve antibiyotik direnç genlerini aktardığından, güncel çalışmaların konusudur (Dramsi, Trieu-Cuot ve Bierne, 2005; Chajęcka ve ark., 2017). Agregasyon maddesi, seks feromonlarının aracılık ettiği, basitleştirilmiş bir konjugasyon sistemine aktarılan büyük konjugatif plazmidlerde kodlanan bir dizi yüksek homolog adezyon içerir (Strzelecki ve ark., 2011). Cinsiyet feromonları, spesifik bir konjugatif plazmid ile etkileşime giren ve agregasyon maddesine katılan kısa, hidrofobik peptitlerdir (Clewell, An, Flannagan, Antiporta ve Dunny, 2000; Chajęcka ve ark., 2017). Bu aşama, hücreler arasındaki genlerin konjugatif transferinde özel bir öneme sahiptir. Alıcının hücreleri tarafından salgılanan feromonların varlığında, verici hücreleri, alıcı hücre yüzeyi üzerindeki ilgili bir enterokokal bağlayıcı madde (EBS) ligandına bağlanan agregasyon maddesini sentezler (Dunny, Leonard ve Hedberg, 1995). Süreç, hücreler arasında genetik materyal değişimini kolaylaştıran bakteriyel hücrelerden oluşan büyük konjugatif kümelerin oluşması ile sonuçlanır (Kozlowicz, Dworkin ve Dunny, 2006;

Wardal, Sadowy ve Hryniewicz, 2010). Ayrıca sitolizin ve antibiyotik direncinin determinantları gibi diğer enterokok virülans faktörlerinin kodlandığı bir plazmid türü içinde yayılmasında rol oynar. Son olarak, agregasyon maddesi ve sitolizin sinerjistik olarak hareket edebilir, böylece quorum sensing sisteminde sitolizin düzenlemesini devreye sokarak suşun virülansını arttırarak daha derin dokulara zarar vermesini mümkün kılar (Gilmore, Coburn, Nallapareddy ve Murray, 2002; Foulque Moreno ve ark., 2006).

2.3.6. Enterokokkal antijen A

EfaA (endokardis antijeni), *E. faecalis* suşlarında *efaAfs* geni tarafından ve *E. faecium*'da *efaAfm* geni tarafından kodlanan yaklaşık 34 kDa moleküler ağırlığına sahip bir proteindir (Eaton ve Gasson, 2001; Sava, Heikens ve Huebner, 2010). *EfaA* geni, magnezyum iyonları tarafından düzenlenen ABC taşıyıcısını (permeaz) kodlayan *afaCBA* operonunun bir parçasıdır ve mangan eksikliğinde daha fazla ifade edilirler (Abrantes, Kok ve Lopes, 2013).

2.3.7. Seks feromon determinanti

Enterokoklar, sex feromonlarının (*cpd*, *cob*, *ccf*, *cad*) kromozomal olarak kodlanmış genlerinin üretimine dayanan bir plazmid birikim mekanizmasına sahiptir. Feromonlar, 7-8 amino asit uzunluğunda küçük peptitlerdir ve bunlar, hücreler arasında plazmidlerin eşlenik transferini kolaylaştırır (Chandler ve Dunny, 2004). Alıcılar tarafından salgılanan feromonlar donöre özgüdür ve plazmidinin eşlenik operonlarının ifadesini uyarır. Bir tür genellikle birkaç farklı feromon salgılar. Feromonların kendileri dışında, her bir feromona bağlı plazmid, karşılık gelen feromona rekabet eden inhibitörler gibi davranan peptitlerin salgılanmasını kodlar. Feromonlar, donör hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlandığında, bu sinyal iletilir ve agregasyon maddesinin genini uyarır (Clewell, 1993; Dunny ve ark., 1995). *asa1* geninin ekspresyonu, etkili plazmid transferini sağlayan hücre agregalarının oluşumuyla sonuçlanır (Clewell ve ark., 2002).

2.3.8. Hiyaluronidaz

Hiyaluronidaz, molekül ağırlığı 45 kDa'ya yakın olan ve *hyl* geni tarafından kodlanan bir *E. faecium* genom proteinidir (Archimbaud ve ark., 2002). Bu enzim, bağ dokusu ve kıkırdaktaki mukopolisakkaritlerin tahrip edilmesinde ve sonuç olarak bakterilerin

yayılmasında rol oynar. Klinik suşlardaki *hyl* geni, genellikle *E. faecium*'da bulunur ve çok nadiren *E. faecalis*'te de oluşabilir (Vankerckhoven ve ark., 2004). Aynı zamanda, gıdalardan izole edilen *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. durans* türlerinde de bulunmuştur (Trivedi ve ark., 2011). Klinik kökenli suşlar genellikle gıda da dahil olmak üzere diğer kaynaklardan izole edilenlerden daha fazla virülans faktörü içerir, gıda kaynaklı suşlar doğrudan enfeksiyon kaynağı olmamakla birlikte virülans genlerinin yayılmasını teşvik edebilir (Comerlato, Resende, Caierao, ve D'azevedo, 2013; Eaton ve Gasson, 2001; Jimenez ve ark., 2013). Bu nedenle bu konu ile ilgili daha çok araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır. *Enterococcus* cinsinin bakterileri konjugasyon yoluyla genetik materyali değiştirme yeteneğine sahiptir ve bu süreç sıklıkla gastrointestinal kanalda meydana gelir (Huddleston, 2014). Genellikle bir plazmid feromonları, antibiyotik direncini ve virülans faktörlerini kodlayan genleri içerebilir (Franz ve ark., 2001; Giraffa, 2002, Chajęcka ve ark., 2017).

2.4. Biyofilm

Biyofilm, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunmuş ve ekzopolimerik maddeler, proteinler, polisakkarit ve nükleik asitlerin sulu matrisinde yer alan bir hücre popülasyonudur (Costerton, 2001). Biyofilm üretimi, birkaç bakteri patojeninde quorum sensing sistemleri ile düzenlenir. Biyofilmlerin yok edilmesi oldukça zordur ve birçok kronik enfeksiyon kaynağıdır. Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne göre, biyofilmler tıbbi açıdan önemlidir ve vücuttaki mikrobiyal enfeksiyonların % 80' inden fazlasını oluşturur (Lewis, 2001). Abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğinin enterokokların önemli bir virülans özelliği olduğu düşünülmektedir (Donelli ve Guaglianone, 2004, Donlan, 2002). Bir biyofilm, bir yüzeye bağlı ve birincil polisakkarit materyalin matriksinde yer alan bir mikrobiyal hücre topluluğudur. Biyofilm yapısı bakteriler arasındaki genetik materyalin değişimi için en uygun ortamı sağlar ve bakterinin antibiyotiklere ve konakçı immün tepkisi aktivitelerine karşı doğuştan gelen direncini artırır (Donlan, 2002). Enterokok, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, kök kanalı enfeksiyonları, oküler enfeksiyonlarda (Distel ve ark., 2002; Donlan, 2002; Mohamed ve ark., 2004; Zegans ve ark., 2002), yapay kalça protezlerinde, intrauterin cihazlarda, protez kalp kapaklarında, kateterlerde ve stentlerde biyofilmlerin bulunduğu çeşitli cihazlarla ilgili enfeksiyonlar da biyofilmlerle ilişkilendirilmiştir (Dautle ve ark., 2002; Donlan, 2002; Leung ve ark., 2000; Sabbuba ve ark., 2002). Biyofilmlerin temel bir özelliği, antibiyotiklere ve enzimlere karşı koruma sağlamaya yardımcı olan hücre dışı polisakkarit matriksinin oluşturulmasıdır ve

popülasyonun metabolik etkileşimi için bir mikro ortam oluşumunu destekler (Lewis, 2001; Salas-Jara ve ark., 2016).

Yüzey proteini *esp*, yapışma ve biyofilm oluşumunda ve daha sonra özellikle idrar yolu enfeksiyonunda enterokok patogeneğinde rol oynar (Van Wamel ve ark., 2007). Salgılanan *gelE* metaloproteaz kollajen, kazein ve hemoglobini parçalar ve ardından biyofilm gelişimi oluşur (Hancock ve Perego, 2004). Ayrıca, çeşitli çalışmalarda, *Esp*'in polistiren ve biyofilm oluşumuna primer bağlılıkta temel olduğu görülmüştür (Mohammed ve ark., 2004; Tendolkar ve ark., 2004).

Biyofilm oluşturan bakteriler, tüm hastane enfeksiyonlarının %65 'inden fazlasını ve üroloji alanında ciddi bir sorun haline gelebilecek %80 bakteriyel enfeksiyonları içermektedir (Donlan, 2002; Soto, 2014). Bakteriyel biyofilmlerin tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarında ve antimikrobiyal ilaç direncindeki rolü halk sağlığı için büyük öneme sahiptir. Antimikrobiyal dirençli fenotip nedeniyle bakteriyel şekillendirme biyofilminin yok edilmesi zordur. Bu nedenle, bakteriyel biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi için kombinasyon terapileri önerilmektedir (Salas-Jara ve ark., 2016).

2.5. Enterokoklarda Plazmid DNA

DNA yapısında içinde bulunduğu hücreye bazı önemli özellikler kazandıran ve bu özellikleri genetik kontrol altında tutan elementlere plazmid denilmektedir. Plazmidler çift iplikli DNA molekülünden yapılmış, sitoplazma içerisinde dairesel yapıda bir uçları ile bakteri sitoplazmasının bir noktasına bağlanmış şekilde, bakteri kromozomundan ayrı olarak replike olabilen bakteri kromozomundan daha küçük genetik elementlerdir. Plazmidler antimikrobiklere ve ağır metallere direnç genleri yanında değişik virulans faktörlerini de taşıyabilirler. R-plazmidi denen direnç plazmidleri bir veya daha çok sayıda antibiyotige karşı direnç genlerini taşımaktadır. Direnç plazmidleri diğer duyarlı bakterilere transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarıyla geçerek direnç gen paketini aktarır ve böylece direncin yayılmasına neden olur. Hayvansal kökenli gıdalardan elde edilen enterokokların, özellikle virülans genlerin aktarılabilir genetik elemanlar üzerinde bulunmasından dolayı, antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli bir rol oynayabileceği kesindir (Clewell ve ark., 1995; Vignaroli ve ark., 2011; Jahan ve ark., 2015).

2.6. Enterokokların Güvenilirliği

Direnç ve virölans faktörlerinin yüksek prevalansı enterokok suşlarının güvenlik değerlendirmesini zorlaştırmaktadır (EFSA, 2008). Enterokoklar birçok antibiyotiğe karşı dirençli ya da toleranslıdır. Diğer bakterilerde direnç sağlayan genetik diziler içeren kromozom, plazmid transferi veya transpozon edinimi yoluyla ilaca direnç kazanabilirler (Belgacem ve ark., 2010; Hammerum, Lester ve Heuer, 2010). Aktarılabılır antibiyotik dirençli plazmidlerin yanı sıra, virölans faktörlerinin, yüksek verimli gen transfer mekanizmalarıyla bulaşıcı olduğu bilinmektedir (Eaton ve Gasson, 2001). Enterokoklarda sitolisinler, jelatinaz, serin proteaz, hiyalüronidaz, agregasyon maddesi, hücre dışı yüzey proteini, hücre duvarı adhezinleri ve biyofilm oluşumu dahil olmak üzere birçok virölans faktörü tanımlanmıştır (Barbosa, Gibbs ve Teixeira, 2010; Chajęcka ve ark., 2016). Süt ürünlerinden izole edilen enterokoklarda insan enfeksiyonları ile ilişkili olanlara benzer bir virölans gen profili ifade edilmektedir (Gelsomino ve ark., 2003; Semedo ve ark., 2003). Nitekim, peynirde bulunan enterokoklar, insan bağırsak kanalında kalabilen çoklu ilaç direnci veya virölans suşlarının aktarımı için olası bir ara araç olabileceği bildirilmektedir (Jamet ve ark., 2012; Kayser, 2003; Novais ve ark., 2005).

2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından bir deoksiribo nükleik asit (DNA) aranması amacıyla keşfedilmiş (Mullis ve ark., 1986) ve bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı in vitro bir tekniktir. PCR metodu, teşhis, epidemiyolojik ve DNA miktarı belirleme çalışmaları gibi birçok amaçla kullanılmakta ve geliştirilmeye devam edilmektedir (Kahya ve ark., 2013)

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada, Türkiye ve İran' ın farklı bölgelerinde üretilen beyaz peynirlerden izole edilen (Çizelge 3.1) ve Hajikhani (2011) tarafından probiyotik özellikleri belirlenmiş ve moleküler olarak tanımlanmış toplam 20 *Enterococcus faecium* suşları kullanılmıştır (Hajikhani, 2011). Bu çalışmada kullanılan tüm suşlar Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suşlar ve izolasyon kaynağı

No	Probiyotik Özellikleri Belirlenen Suşlar	İzolasyon Kaynağı Peynirler
1	<i>Enterococcus faecium</i> RI 5	Ahbar (Tam Yağlı)
2	<i>Enterococcus faecium</i> RI 30	Tebriz Lıgvan (Yarım Yağlı)
3	<i>Enterococcus faecium</i> RI 41	Ardabil (Tam Yağlı)
4	<i>Enterococcus faecium</i> RI 46	Ardabil (Tam Yağlı)
5	<i>Enterococcus faecium</i> RI 53	Ahvaz (Yarım Yağlı)
6	<i>Enterococcus faecium</i> RI 55	Ahvaz (Yarım Yağlı)
7	<i>Enterococcus faecium</i> RI 61	Ahvaz (Yarım Yağlı)
8	<i>Enterococcus faecium</i> RI 64	Ahvaz (Yarım Yağlı)
9	<i>Enterococcus faecium</i> RI 68	Hamadan (Yarım Yağlı)
10	<i>Enterococcus faecium</i> RI 70	Hamadan (Yarım Yağlı)
11	<i>Enterococcus faecium</i> RI 71	Hamadan (Yarım Yağlı)
12	<i>Enterococcus faecium</i> RI 74	Hamadan (Yarım Yağlı)
13	<i>Enterococcus faecium</i> RI 75	Hamadan (Yarım Yağlı)
14	<i>Enterococcus faecium</i> RI 78	Hamadan (Yarım Yağlı)
15	<i>Enterococcus faecium</i> RI 79	Hamadan (Yarım Yağlı)
16	<i>Enterococcus faecium</i> RI 80	Hamadan (Yarım Yağlı)
17	<i>Enterococcus faecium</i> RT 81	Balıkesir (Yarım Yağlı)
18	<i>Enterococcus faecium</i> RT 82	Balıkesir (Yarım Yağlı)
19	<i>Enterococcus faecium</i> RT 94	Balıkesir (Yarım Yağlı)
20	<i>Enterococcus faecium</i> RT 101	Urfa Peyniri (Tam Yağlı)
21.	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 20477*	

RT: Türkiye peynirlerinden izole edilen suşlar

RI: İran peynirlerinden izole edilen suşlar

*Standart kültür

3.1.1. Test bakterileri

Esherichia coli ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* DSM 20477, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 test bakterileri olarak kullanılmıştır. Test bakterileri laboratuvar kültür koleksiyonumuzda mevcut olan bakterilerdir.

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Araştırmada kullanılan *E. faecium* suşlarının aktifleştirilmesinde, geliştirilmesinde ve diğer çalışmalarda Man Rogosa ve Sharp (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır (Man ve ark., 1960). Bu besiyerinin içeriği Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Araştırmada kullanılan MRS besiyerinin içeriği

Maddeler	g/L	Kimyasal marka
Pepton	10,0	Merck
Beef ekstrakt	10,0	Merck
Yeast ekstrakt	5,0	Merck
Glikoz	20,0	Merck
K ₂ HPO ₄	2,0	Merck
Na-Asetat. 3H ₂ O	5,0	Merck
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2	Merck
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05	Merck
Tween 80	1,0 mL	Merck
Amonyum Sitrat	2,0	Merck

Belirlenen miktarlarda maddeler tartılıp 1000 mL distile su ile tamamlanmıştır. Besiyerinin pH'ı 0,01 M HCl ve 0,01 M NaOH kullanılarak $6,2 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Katı besiyerinin hazırlanmasında ise besiyerine % 1,5 oranında agar ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir.

3.1.3. Bakterilerin geliştirilmesi ve muhafazası

Bakterilerin aktifleştirmesi ve geliştirilmesinde MRS sıvı ve katı besiyeri kullanılmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm bakteriler MRS içerisine %1 olacak şekilde ekilmiş ve $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Denemelere alınmadan önce, iki kez aktifleştirilmiş kültürler McFarland (0,5) (Biosan Den-1) ayarlamaları yapılmıştır. Bakteriler 1 mL gliserol cryo tüplerine ilave edilerek, 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Aktif kültürden 1 mL alınarak steril gliserol içeren tüplere aktarılmış ve bakteri kültürleri -80°C 'de muhafaza edilmiştir. Stoklar altı ayda bir aktifleştirilerek yenilenmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. *E. faecium* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

E. faecium suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Sanchez ve ark., (2007)' nın yöntemiyle Kirby Baver disk difüzyon yöntemine göre ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsüne (Clinical Laboratory Standarts Institute – CLSI, 2015) göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre;

1. *E. faecium* suşları MRS sıvı besiyerinde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ ' de 18-24 saat inkübe edilerek iki kez aktifleştirilerek yoğunlukları Mac Farland cihazında (0,5) ayarlanmıştır.
2. Sistein (2 g/L) içeren MRS katı besiyerine 100 μL koyularak homojen şekilde yayma ekim yapılmıştır.
3. Duyarlılık deneyinde kullanılan antibiyotikler, kısaltmaları, doz içerikleri, dâhil oldukları antibiyotik grupları ve etkinlik dozları Çizelge 3.3' de verilmiştir. Antibiyotik diskleri ikişer paralelli olarak katı besiyerinin üzerine steril bir şekilde yerleştirilmiştir.
4. Petri plakları etüvde 37°C ' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyon sonrası antibiyotik disk çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile milimetrik olarak ölçülmüştür.
6. *E. faecium* suşları üzerindeki duyarlılık testlerinin sonuçları CLSI kriterlerindeki değerler ile karşılaştırılarak, bakteriler test edilen antibiyotiğe karşı duyarlı, orta derecede duyarlı veya dirençli olarak değerlendirilmiştir (CLSI, 2015).

Çizelge 3.3. Test edilen antibiyotikler, kısaltmaları, etki mekanizmaları, doz içerikleri, antibiyotik grupları ve etkinlik dozları (CLSI, 2015)

Grup	Antibiyotik ve kısaltması	Etki mekanizması	Doz içeriği	Dirençli	Orta Derecede Duyarlı	Duyarlı
Aminoglikozit	Gentamisin(CN)	Protein sentezi inhibitörü	30 µg	-	≤9	≥10
Penisilinler	Penisilin G (P)	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	10U	≤14	-	≥15
	Ampisilin (AMP)	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	25 µg	≤16	-	≥17
Tetrasiklin	Tetrasiklin (TE)	Protein sentezi inhibitörü	30 µg	≤14	15-18	≥19
Amfenikol	Kloramfenikol(C)	Protein sentezi inhibitörü	30 µg	≤12	13-17	≥18
Makrolid	Eritromisin (E)	Protein sentezi inhibitörü	15 µg	≤13	14-22	≥23
Glikopeptit	Vankomisin (VA)	Hücre duvarı sentezi inhibitörü	30 µg	≤14	15-16	≥17
Glikopeptit	Polimiksin B (PB)	Sitoplazmik zar sentezi inhibitörü	300 U	≤8	9-11	≥12
Ansamisin	Rifampisin (RD)	Nükleik asit sentezi inhibitörü	5 µg	≤16	17-19	≥20
Kinolon	Ofloksasin (OFX)	Nükleik asit sentezi inhibitörü	5 µg	≤14	15-21	≥22

Çoklu antibiyotik direnç indeksi (ÇAD)

Tüm bakterilerin çoklu antibiyotik direnç indeksi test organizmasının dirençli olduğu antibiyotik sayısının toplam denenen antibiyotik sayısına oranı ile hesaplanmıştır.

$$\text{ÇAD} = \frac{\text{İzolatin dirençli olduğu antibiyotik sayısı}}{\text{İzolatin maruz bırakıldığı antibiyotik sayısı}}$$

ÇAD indeksi her bir suş için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Hesaplanan ÇAD indeksi eğer 0,2'den daha büyükse organizmanın yoğun antibiyotik kullanılan bir kaynaktan geldiği, 0,2'ye eşit veya daha küçük ise, antibiyotiğin hiç kullanılmadığı ya da az kullanıldığı bir ortamdan kaynaklandığı bildirilmiştir (Aktürk ve ark., 2010).

3.2.2. Jelatin Hidroliz Testi

E. faecium suşlarının jelatin hidrolizini saptamak için MRS sıvı besiyerine %10 Jelatin (Merck) ilave edilerek pH'ı 7,2 ye ayarlanarak sıvı besiyeri otoklavda 115°C'de 20 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası tüpler dik vaziyette oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan besiyerine saplama ekim yapılarak 37°C' da 10-30 gün inkübasyona

bırakılmıştır. Besiyerinde jelatin hidroliz aktivitesine bağlı olarak sıvılaşma meydana gelip gelmediği hergün etüvden çıkarılıp yaklaşık 1 saat buzdolabında 28°C altına düşürülüp kontrol edilmiştir. Test sonunda sıvı durumundaki örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Jelatin hidroliz testinde *S. aureus* ATCC 25923 suşu pozitif kontrol olarak kullanılırken boş besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Temiz, 2014).

3.2.3. *E. faecium* suşlarının hemolizin aktivitelerinin belirlenmesi

E. faecium suşlarının hemolizin aktivitesinin araştırılmasında Al Atya ve ark., (2015) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Yöntem sırasıyla;

1. *E. faecium* suşları MRS sıvı besiyerinde ard arda iki kez aktifleştirilmiştir ve Mc Farland (Biosan Den-1) 0,5'e ayarlanmıştır.
2. Aktif kültürden hazır kanlı agar (Or- Bak) içeren petri plaklarına öze yardımıyla çizgi ekim yapılmıştır.
3. Petri plakları 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
4. İnkübasyon sonrası koloni etrafında parlak-yeşil zon oluşturan koloniler α - hemolitik, berrak zon oluşturanlar β -hemolitik, zon oluşturmayanlar ise γ -hemolitik olarak değerlendirilmiştir.
5. Kontrol bakterisi olarak *E. faecium* DSM 20477 suşu kullanılmıştır.

3.2.4. Biyofilm oluşumunun mikropate yöntemi belirlenmesi

Aktif MRS kültüründen agar ortamına çizgi ekim yapılmış ve bakteriler katı besiyerinde geliştirilmiştir. Katı ortamda gelişen kolonilerden 3-4 tanesi alınarak MRS sıvı besiyerine aktarılmış ve bir gece 37°C da tekrar geliştirilmiştir. Aktif kültürünün yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve değerler kaydedilmiştir. Yoğunluğu belirlenmiş kültür 1/100 oranında MRS sıvı besiyerinde içinde seyreltilmiş ve 200 μ L mikropate kuyularına 3 tekrar halinde aktarılmıştır. Yoğunluğu belirlenmiş kültürden aynı zamanda dilüsyon ve yayma ekim yapılarak canlılık sayımı yapılmıştır. Negatif kontrolde sadece 200 μ L MRS broth eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 kullanılmıştır. Ekim yapılan mikropate 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bakterilerin gelişme oranı 600 nm'de spektrofotometre ile ölçülüp kaydedilmiştir. Büyüme

yoğunluğu belirlendikten sonra kuyu içeriği atılmış ve kuyular 3 kez steril 300 µL PBS (NaCl %0,8, KCl % 0,02, Na₂HPO₄ % 0,144, KH₂PO₄ % 0,024, pH 7,2) ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 20 dakika boyunca 150 µL metanol ile biyofilmi oluşturan (yıkama sonrasında kalan) bakteriler fikse edilmiştir. Fiksasyondan sonra plate yavaşça boşaltılmış ve ters bir pozisyonunda gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Her bir mikrotitre plate kuyusunda oluşturulan yapışık biyofilm tabakası, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca Gram boyama için kullanılan 150 µL kristal violet ile boyanmıştır. Boyama işleminden sonra boya ortamdan pipet yardımıyla uzaklaştırılarak mikrotitre plakası musluk suyu altına yerleştirilmiş ve plate serbest boyadan arındırılana kadar yıkanmıştır. Yıkama adımından sonra plateler oda sıcaklığında iyice kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra hücrelere bağlanmış boya 150 µL % 33'lük glasiyel asetik asit ile yeniden çözündürülmüştür. Kristal violet ile boyanan her bir oyuğun optik yoğunluğu (OD), bir mikrotiter-plaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçülmüş ve sayısal veriler kaydedilmiştir. Test edilen tüm suşların pozitif ve negatif kontroller için ortalama OD değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra cut-off değeri (OD_c) oluşturulmuştur.

$OD_c = \text{Negatif kontrolün ortalama OD'si} + (\text{negatif kontrolün } 3 \times SD \text{ (standart sapma)})$

Test edilen bir suşun nihai OD değeri, OD_c değeri ile indirgenen suşun ortalama OD değeri olarak ifade edilmektedir ($OD = \text{suşun ortalama OD'si} - OD_c$). OD_c değeri her bir mikrotitre plate'i için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Negatif bir değer elde edildiğinde sıfır olarak sunulmuş, herhangi bir pozitif değer ise biyofilm üretimini göstermektedir. Buna göre;

$OD_{suş} \leq OD_c$ ise biyofilm üreticisi yok,

$OD_c < OD_{suş} \leq 2 \times OD_c$ ise zayıf biyofilm üreticisi,

$2 \times OD_c < OD_{suş} \leq 4 \times OD_c$ ise orta biyofilm üreticisi,

$4 \times OD_c < OD_{suş}$ ise güçlü biyofilm üreticisi şeklinde değerlendirilmiştir (Stepanović ve ark., 2007).

3.2.5. *E. faecium* suşlarının PZR ile vankomisin direnç ve virülans gen bölgelerinin belirlenmesi

Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit ile yapılmıştır. Kit prosedürüne göre öncelikle; *E. faecium* suşları MRS sıvı besiyerinde ard arda iki kez aktive edilmiştir. Aktif kültür yoğunluğu 2×10^9 'a ayarlanmış ve mikrosantrifüj tüpüne 1,5- 2 mL koyularak 10 dk 5000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır ve tüpte biriken pellet 180 µL Gram(+) lizis tamponu ile süspanse edilerek 37°C'de 30 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 200 µL Lizis solüsyonu 20 µL Proteinaz K eklenerek vorteks ile homojen süspansiyon elde edilmiştir. Numune 56°C' de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 20 µL RNaz A solüsyonu eklenerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 10 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 400 µL %50'lik etanol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Hazırlanmış çözelti (lizat) koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş GeneJET genomik DNA Pürifikasyon Kolum'a aktarılmış ve 6000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Kolum temiz bir koleksiyon tüpüne aktarılmıştır. GeneJET genomik DNA Pürifikasyon koluma 500 µL etanol içeren yıkama tamponu I eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpünde ki sıvı boşaltılmış ve kolum geri yerleştirilmiştir. GeneJET genomik DNA Pürifikasyon koluma 500 µL etanol içeren yıkama tamponu II eklenmiş ve 3 dk. maksimum devir (>12000 rpm)'de santrifüj edilmiştir. GeneJET genomik DNA Pürifikasyon kolumu steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. GeneJET genomik DNA Pürifikasyon kolumun tam merkezine 200 µL Elüsyon tamponu eklenmiş ve 2 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak 1 dk. 8000 rpm'de santrifüj edilmiş, izole edilen genomik DNA moleküllerinin bütünlüğü ve saflığı, %1' lik agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. DNA saflık kontrolü için 260 / 280 nm'deki absorbansları dikkate alınarak belirlenmiştir. OD260 / OD280 oranının 1,8 – 2,0 arasında olması DNA'nın saf olduğu, bu miktardan az olması RNA kontaminasyonu olduğu ve bu aralıktan daha fazla olması da protein kontaminasyonu olduğu şekilde yorumlanmıştır. İzole edilen DNA çalışmalarda kullanılmak için -20°C'de saklanmıştır.

Tampon ve Çözeltiler:

Lizis Tamponu: 20mM Tris- HCl, pH: 8,0; 2 mM EDTA, %1,2 Triton X-100, Lizozim 20 mg/ mL

Yıkama tamponu I: 30 mL%96'lık etanol eklenerek son hacim 40 mL'ye tamamlanmıştır.

Yıkama tamponu II: 30 mL%96'lık etanol eklenerek son hacim 40 mL'ye tamamlanmıştır.

Elüsyon tamponu: 10 mM Tris- HCl, pH:9; 0, 0,1 mM EDTA

Primerler

Enterokokların PZR ile vankomisin direnç ve virülans gen bölgelerinin belirlenmesi için Çizelge 3.4' de verilen primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Araştırmada kullanılan primerler

Gen	Virulens Faktör	Primer dizisi (5'-3')	Bant büyüklüğü (bp)	Tm°C	Referans
<i>vanA</i>	Vankomisin direnç	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAAT A	1030	48°C	(Armin ve ark., 2017)
<i>vanB</i>		CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA CCGCCATCCTCCTGCAAAAA GTGACAAACCGGAGGCGAGG			
<i>cylA</i>	Sitolizin	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	49°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Hällgren ve ark., 2009)
<i>cylB</i>		ATTCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	843	47°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Hällgren ve ark., 2009)
<i>gelE</i>	Jelatinaz	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	51,2°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu ve ark., 2015)
<i>esp</i>	Enterokokkal yüzey proteini	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCAATGCCGAA	933	58°C	(Eaton ve Gasson, 2001)
<i>asa1</i>	Agregasyon faktörü	GCACGCTATTACGAACATATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	48°C	(Vankerckhoven ve ark., 2004; Ahmadova vd., 2013; Cebrián ve ark., 2012)
<i>agg</i>	Hücre agregasyonu ve konjugasyonu	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	49°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Pieniz ve ark., 2015)
<i>efaAfm</i>	<i>E. faecium</i> yüzey antijeni	AACAGATCCGCATGAATA CATTCATCATCTGATAGTA	735	47°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu ve ark., 2015)
<i>cob</i>	Seks feromon determinantları	AACATTACAGCAACAAAGC TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	494	48°C	-
<i>ccf</i>		GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	543	51,2°C	(Eaton ve Gasson, 2001; Liu ve ark., 2015)
<i>hyl</i>	Hiyaluronidaz	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTCCAA	1065	52°C	-

PZR

Vankomisin direncine ait *van A* ve *van B* gen bölgelerinin PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Çizelge 3.5’de, PZR reaksiyonunda kullanılan maddeler son hacim ve volümleri ise Çizelge 3.6 ’de gösterilmiştir. T_m (bağlanma sıcaklığı, °C) her bir primer için ayrı ayrı $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ formülü kullanılarak hesaplanmış ve *vanA* gen bölgesi için bağlanma sıcaklığı (T_m) sıcaklığı 48°C, *vanB* gen bölgesi için bağlanma sıcaklığı 49°C olarak ayarlanmıştır (Poeta ve ark., 2005).

Çizelge 3.5. *VanA* ve *vanB* gen bölgesine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)
Başlangıç	1	94	5
Denatürasyon	30	94	1
Bağlanma		TM	1
Uzama		72	1
Son Uzama	1	72	10

Çizelge 3.6. *VanA* ve *vanB* gen bölgelerinin PZR reaksiyonu

PZR reaksiyon içeriği	Reaksiyon hacmi
DNA (20 ng)	2,5 µL
Taq Buffer (10X) (20 mM MgCl ₂)	5 µL
dNTP (10 mM)	0,2 µL
F- Primer	1 µL
R- Primer	1 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
dH ₂ O	40,05 µL
Toplam	50 µL

Virülans genlerden, enterokokkal yüzey antijen A (*efaAfm*), enterokokkal yüzey proteini (*esp*), agregasyon maddesi (*agg*), sitolizin (*cylA*, *cylB*) ve seks feromon determinantının (*cob*, *ccf*) PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Çizelge 3.7’de, PZR reaksiyonunda kullanılan maddeler son hacimleri ile Çizelge 3.8 ’de gösterilmiştir. T_m (bağlanma sıcaklığı, °C) her bir primer için ayrı ayrı $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ formülü kullanılarak hesaplanmış ve *EfaAfm* ve *cylB* gen bölgeleri için bağlanma sıcaklığı (T_m) sıcaklığı 47°C, *cob* için T_m sıcaklığı 48°C , *agg* ve *cylA* gen bölgeleri için T_m sıcaklığı 49°C, *ccf* ve *gelE* gen bölgeleri için T_m sıcaklığı 51,2°C ve *esp* için T_m sıcaklığı 58°C olarak ayarlanmıştır (Eaton ve Gasson, 2001).

Çizelge 3.7. *EfaAfm*, *esp*, *agg*, *cylA*, *cylB*, *cob*, *ccf* gen bölgelerine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)
Başlangıç	1	94	5
Denatürasyon	1	94	2
Bağlanma		Tm	2
Uzama		72	2
Denatürasyon		92	15 sn
Bağlanma	30	Tm	15 sn
Uzama		72	15 sn
Son Uzama	1	72	10

Çizelge 3.8. *Efaafm*, *esp*, *agg*, *cylA*, *cylB*, *cob*, *ccf* gen bölgelerinin PZR reaksiyonu

PZR reaksiyon içeriği	Reaksiyon hacmi
DNA (20 ng)	2,5 µL
Taq Buffer (10X) (20 mM MgCl ₂)	5 µL
dNTP (10 mM)	1 µL
F- Primer	1 µL
R- Primer	1 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
dH ₂ O	31,25 µL
Toplam	45 µL

Virülans genlerden *asa1* ve *hyl* gen bölgelerinin PZR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Çizelge 3.9’da, PZR reaksiyonunda kullanılan maddeler son hacim ve volümleri ile Çizelge 3.10 ’da gösterilmiştir. Tm (bağlanma sıcaklığı, °C) her bir primer için ayrı ayrı $Tm = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ formülü kullanılarak hesaplanmış ve *asa1* gen bölgesi için bağlanma sıcaklığı (Tm) sıcaklığı 48°C, *hyl* gen bölgesi için bağlanma sıcaklığı 52°C olarak ayarlanmıştır (Ahmadova ve ark., 2013).

Çizelge 3.9. *Asa1* ve *hyl* gen bölgelerine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)
Başlangıç	1	94	5
Denatürasyon	30	94	30 sn
Bağlanma		TM	30 sn
Uzama		72	30 sn
Son Uzama	1	72	7

Çizelge 3.10. *Asa1* ve *hyl* gen bölgelerinin çoğaltılması

PZR reaksiyon içeriği	Reaksiyon hacmi
DNA (20 ng)	2,5 µL
Taq Buffer (10X) (20 mM MgCl ₂)	5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
F- Primer	1 µL
R- Primer	1 µL
Taq Polimeraz	0,25 µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,3 µL
dH ₂ O	39,45 µL
Toplam	50 µL

Genomik DNA'ların agaroz jelde yürütülmesi

PZR ürünlerinden, 9 µL ampikon ve 1 µL DNA yükleme boyası (DNA loading dye, (Thermo Scientific) ile karıştırılmış ve % 1,5'lik agaroz jelde 1,5 saat 80 V, 0,05 mg/mL EvaGreen (floresan jel boyası) içeren 1X TAE' de elektroforeze tabi tutulmuştur. PZR ürünleri 100 bp'lik DNA ladder (Jena Bioscience) (Şekil 3.1) kullanılarak elektroforez sonrası, jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad) görüntülenmiştir.



Şekil 3.1. Genomik DNA'nın moleküler büyüklükleri

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltisi ve jel hazırlanışı10XTAE tampon çözeltisi

Tris Base..... 4,84 g/L

Glasiyel Asetik Asit..... 1,14 mL/L

EDTA..... 0,372 g/L

Distile su ile hacim 1000 mL'ye tamamlanarak 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilerek, pH 8,0'e ayarlanmıştır.

1X TAE Kullanma Solusyonu

10X TAE..... 100 mL

Distile su..... 900 mL

Belirtilen miktarda 10X TAE üzerine 900 mL distile su eklenerek 1XTAE hazırlanmıştır.

Genomik DNA için agaroz jel hazırlanışı

Agaroz (Sigma) 1,5 g

TAE (1X).....100 mL

Belirtilen miktarda agaroz tartılıp üzerine 1XTAE ilave edilerek mikrodalga fırında 3-5 dk kaynatılmıştır ve 40– 50°C'ye kadar soğutulmuştur. Sıvı halde olan karışım jel kabının içerisine dikkatlice dökülmüştür ve yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar

yerleştirilerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan ve katı forma dönüşen jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

3.2.6. DNA dizi analizi

Elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizi Nitta Laboratuvar Ürünleri İthalat İhracat Limited firmasında hizmet alımı şeklinde yaptırılmış ve *vanA* gen bölgesi için *E. faecium* RI-5, *vanB* gen bölgesi için *E. faecium* RI-46, *gelE* gen bölgesi için *E. faecium* RI-68 ve RT-94, *agg* gen bölgesi için *E. faecium* RI-74, *asa1* gen bölgesi için *E. faecium* RT-94, *efaAfm* gen bölgesi için *E. faecium* RI-41 ve RT-101, *cob* gen bölgesi için *E. faecium* RT-94, *ccf* gen bölgesi için, *E. faecium* RI-80 ve *hyl* gen bölgesi için *E. faecium* RI-64 suşları tesadüfen seçilerek sonuçlar Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak değerlendirilecektir.

3.2.7. *E. faecium* suşlarında plazmid DNA izolasyonu

E. faecium suşlarının plazmid DNA' ları, Plasmid Miniprep DNA İzolasyon kiti (GeneMATRIX) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit prosedürüne göre;

Öncelikle GeneMATRIX plazmid izolasyon kolum' a 40 µL aktivasyon çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir. MRS sıvı besiyerinde ard arda iki kez aktiveleştirilen *E. faecium* suşları 1,5-2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine konularak 14.000 rpm' de 2 dk. santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Dipte kalan pellet 250 µL Cell-R tamponu ile süspanse edildikten sonra sırasıyla 200 µL Lizis tamponu ve 350 µL Nötralizasyon tamponu eklenerek 14.000 rpm' de 7 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı daha önce oda sıcaklığına aktivasyona bırakılmış colum'a transfer edilmiş ve 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmış colum tekrar yerleştirilerek 500 µL yıkama tamponu ilave edilmiştir. 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak 650 µL yıkama tamponu 2 ilave edilmiş ve 12.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Kolum kısmı steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiş ve columun tam merkezine 50-100 µL Elüsyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 2dk. inkübe edilmiştir. Son olarak 12.000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiş, izole edilen plazmid DNA moleküllerinin bütünlüğü ve saflığı, %1'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Plazmid DNA saflık kontrolü için 260 / 280 nm'deki absorbansları dikkate alınarak belirlenmiştir. OD260 /

OD280 oranının 1,8 – 2,0 arasında olması DNA'nın saf olduğu, bu miktardan az olması RNA kontaminasyonu olduğu ve bu aralıktan daha fazla olması da protein kontaminasyonu olduğu şekilde yorumlanmıştır. İzole edilen plazmid DNA çalışmalarda kullanılmak için -20°C' de saklanmıştır.

Plazmid DNA' ların Agaroz Jelde Yürütülmesi

Plazmid DNA' lar % 0,7'lik agaroz jelde 2,5 saat 40 V, 0,05 mg/mL EvaGreen (floresan jel boyası) içeren 1X TAE'de elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntüleri moleküler ağırlık standardı (λ DNA/HindIII; Thermo Scientific) ile karşılaştırılarak görüntüleme sisteminde (Bio-Rad) incelenmiştir.

1X TAE Kullanma Solusyonu

10X TAE..... 100 mL
Distile su..... 900 mL

Belirtilen miktarda 10X TAE üzerine 900 mL distile su eklenerek 1X TAE hazırlanmıştır.

Plazmid DNA için agaroz jel hazırlanışı

Agaroz (Sigma)0,7 g
TAE (1X).....100 mL

Belirtilen miktarda agaroz tartılıp üzerine 1X TAE ilave edilerek mikrodalga fırında 3-5 dk kaynatılmıştır ve 40 – 50 °C'ye kadar soğutulmuştur. Sıvı halde olan karışım jel kabının içerisine dikkatlice dökülmüştür ve yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan ve katı forma dönüşen jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

3.2.8. İstatistiksel analiz

Tüm çalışmalar, her çalışma için paralel sayısı değişmek ile birlikte genellikle üç paralelli ve üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (22.0 Versiyonu; SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Çalışmada, vankomisin direnci ile *van A* ve *van B* genleri, sitolizin aktivitesi ile *cylA* ve *cylB* genleri, jelatinaz aktivitesi ile *gelE* geni ve biyofilm ile *esp*, *asa1* genleri arasındaki ilişki Ki- kare testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *E. faecium* Suşlarının Antibiyogram Sonuçları

Bakteriler üzerinde farklı şekillerde etki mekanizmaları olan vankomisin, gentamisin, penisilin-G, tetrasiklin, ampisilin, kloramfenikol, rifampisin, eritromisin, ofloksasin ve polimiksin B antibiyotiklerinin Türkiye ve İran peynirlerinden izole edilmiş 20 *E. faecium* suşunun üzerine inhibisyon etkisi disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş olup (Resim 4.1-4.2) sonuçlar CLSI standardına göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Antibiyotik test sonuçlarına göre, *E. faecium* suşlarının Beta Laktam antibiyotik grubuna dahil olan ve bakterilerde hücre duvar sentezini bozan penisilin ve ampisilin antibiyotiğine karşı %100 duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir. Aynı şekilde bakterilerde hücre duvar sentezini bozan ve makrolid grubuna dahil olan vankomisin antibiyotiğine karşı bakterilerin %100 duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bakterilerde DNA ve RNA sentezini bozan ve florokinolonlar grubuna dâhil olan kloromfenikol antibiyotiğine %100 duyarlılık gösterirken, ofloksasin antibiyotiğine karşı %81 dirençlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Rifampisin antibiyotiğine karşı % 52 dirençli olduğu gözlenmiştir. Bakterilerin sitoplazma membran permalitesini bozan polimiksin B antibiyotiğine karşı %100 dirençli olduğu gözlenmiştir. Bakterilerin ribozomlarda protein sentezini bozan tektrasikline %95 duyarlı, eritromisine %61 orta derecede duyarlı olduğu gözlenirken, aminoglikozid antibiyotik grubuna dâhil olan Gentamisine karşı ise %100 dirençli olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada ayrıca üç veya dört farklı sınıftan antibiyotiğe dirençli suşlar, çoklu antibiyotik dirençli (MDR) olarak değerlendirilmiştir. Çoklu antibiyotik direnç indeksi (ÇAD) Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan 20 bakterinin (referans suş dahil) hepsinin 0,3 ila 0,5 arasında değişen ÇAD indeksine sahip olduğu tespit edilmiştir.

E. faecium RI-70, RI-71, RI-75 ve referans suş *E. faecium* DSM 20477 olmak üzere 4 suş, gentamisin, rifampisin, eritromisin, polimiksin B, ofloksasin antibiyotiklerine çoklu antibiyotik direnci göstermiştir.



(a)



(b)

Resim 4.1. *E. faecium* RI-79 (a) ofloksasin (1) ve rifampisin (2) , *E. faecium* RT-101 (b) vankomisin (1) ve gentamisin (2) antibiyotiklerine karşı duyarlılığı

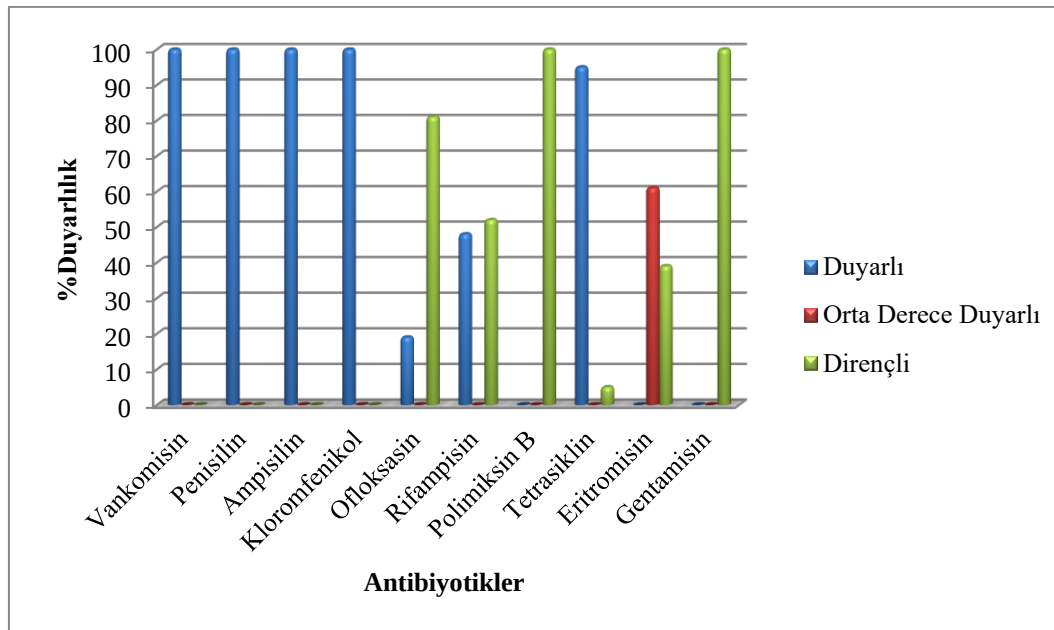


Resim 4.2. *E. faecium* RI-74 suşunun penisilin (1), tektrasiklin (2), eritromisin (3) ve kloromfenikol (4) antibiyotiklerine karşı duyarlılığı

Çizelge 4.1. *E. faecium* suşlarının antibiyogram sonuçları ve ÇAD indeksi

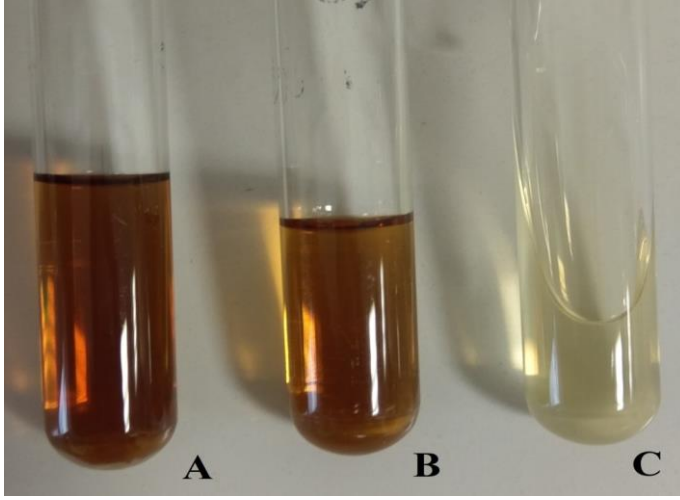
Suşlar	Vankomisin (30 µg)	Gentamisin (30 µg)	Penisilin-G (10 U)	Tetrasiklin (30 µg)	Ampisilin (25 µg)	Kloromfenikol (30 µg)	Rifampisin (5 µg)	Eritromisin (15 µg)	Ofloksasin (5 µg)	Polimiks-B (300 U)	ÇAD indeksi
RI-5	S	R	S	I	S	S	R	I	I	R	0,3
RI-30	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RI-41	S	R	S	S	S	S	R	I	R	R	0,4
RI-46	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RI-53	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	0,4
RI-55	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RI-61	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RI-64	S	R	S	S	S	S	S	R	I	R	0,3
RI-68	S	R	S	S	S	S	R	I	R	R	0,4
RI-70	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5
RI-71	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5
RI-74	S	R	S	S	S	S	R	I	R	R	0,4
RI-75	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5
RI-78	S	R	S	S	S	S	R	I	I	R	0,3
RI-79	S	R	S	S	S	S	R	I	R	R	0,4
RI-80	S	R	S	S	S	S	R	R	I	R	0,4
RT-81	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RT-82	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RT-94	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	0,3
RT-101	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	0,4
DSM 20477*	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	0,5

*, Standart kültür, R, Dirençli; S, Duyarlı; I, Orta Derecede Duyarlı

Şekil 4.1. *E. faecium* suşlarının antibiyotik % duyarlılıkları

4.2. *E. faecium* Suşlarının Jelatin Hidroliz Aktivitelerinin Belirlenmesi

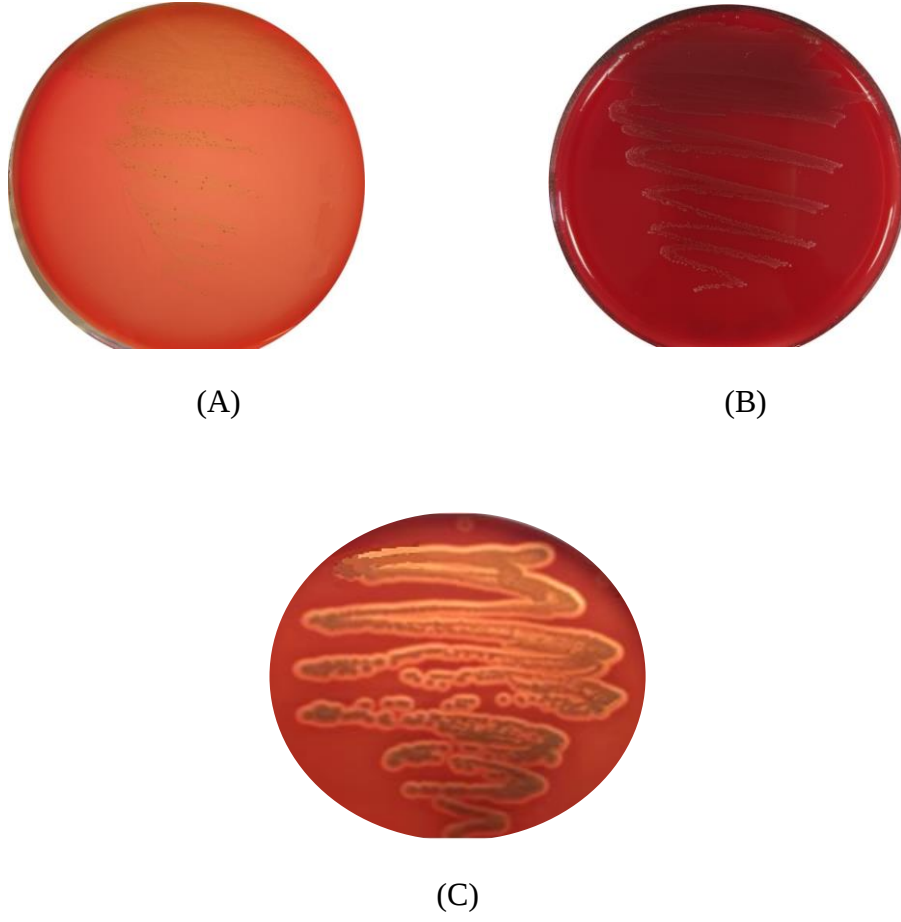
Fenotipik olarak yapılan jelatinaz aktivitesi testi sonucu *E. faecium* suşlarının hiç birisinde jelatinaz aktivitesine bağlı olarak sıvılaşma görülmemiştir (Resim 4.3). Çalışmada pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve negatif kontrol olarak boş besiyeri kullanılmış ve *E. faecium* suşlarının, jelatin hidroliz sonuçları ile karşılaştırılmıştır.



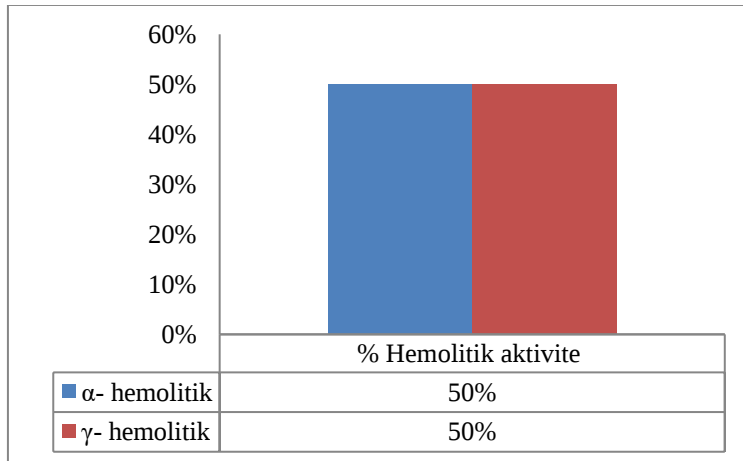
Resim 4.3. *E. faecium* suşlarının jelatin Hidroliz aktivitesi. A. *E. faecium* RI 80, B. Boş besiyeri (negatif kontrol), C. *S. aureus* ATCC 25923 (pozitif kontrol)

4.3. *E. faecium* Suşlarının Hemolizin Aktivitelerinin Belirlenmesi

E. faecium suşlarının hemolizin aktivitesi kanlı agar üzerinde yapılmış ve bu yöntem sonucunda test edilen *E. faecium* suşlarında β -hemolitik aktivite görülmemiştir. Suşların %50'sinde α - hemolitik aktivite (Resim 4.4-A), %50'sinde γ - hemolitik aktivite (Resim 4.4) görülmüştür (Şekil 4.2-B) ve sonuçlar Çizelge 4.2' de gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. coli* suşunun kanlı agar (Or-Bak) besiyerinde tam hemoliz (β - hemoliz) yaptığı belirlenmiştir (Resim 4.4).



Resim 4.4. Sitolizin aktivitesi. (A) *E. faecium* RT-94 (α - hemolitik); (B) *E. faecium* RI-78 (γ - hemolitik); C) *E. coli* ATCC 35218 (pozitif kontrol, β - hemolitik)



Şekil 4.2. *Enterococcus faecium* suşlarının yüzde hemolitik aktiviteleri

Çizelge 4.2. *E. faecium* suşlarının hemoliz sonuçları

Suşlar	α - hemolitik	β - hemolitik	γ - hemolitik
<i>E. faecium</i> RI-5	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-30	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-41	+	-	-
<i>E. faecium</i> RI-46	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-53	+	-	-
<i>E. faecium</i> RI-55	+	-	-
<i>E. faecium</i> RI-61	+	-	-
<i>E. faecium</i> RI-64	+	-	-
<i>E. faecium</i> RI-68	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-70	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-71	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-74	+	-	-
<i>E. faecium</i> RI-75	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-78	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-79	-	-	+
<i>E. faecium</i> RI-80	-	-	+
<i>E. faecium</i> RT-81	+	-	-
<i>E. faecium</i> RT-82	+	-	-
<i>E. faecium</i> RT-94	+	-	-
<i>E. faecium</i> RT-101	+	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218*	-	+	-

*: Pozitif kontrol

4.4. *E. faecium* Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

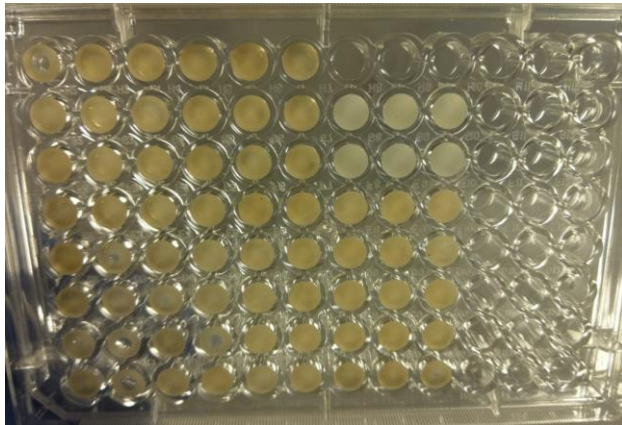
E. faecium suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde, pozitif kontrol olarak *E. faecalis* 29212 suşu (zayıf biyofilm oluşumu) ve negatif kontrol olarak *S. epidermidis* 12228 suşu (biyofilm oluşumu yok) kullanılmıştır (Çizelge 4.3). Çalışmadaki biyofilm aşamaları Resim 4.5- 4.7’de gösterilmiştir. Enterokok suşlarının mikropate ekim yapıldıktan sonra 37°C’de 24 saatlik inkübasyonu sonucu gelişmeleri Resim 4.5’de gösterilmiştir. Enterokokların büyüme yoğunlukları belirlendikten sonra 3 kez steril PBS ile yıkanma aşaması Resim 4.6’da gösterilmiştir. Enterokokların yıkanma ve kurutulma aşaması sonucunda kristal viyole ile boyanma sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm suşların biyofilm üretimi değerlendirilmiştir. Buna göre 20 *E. faecium* suşunun hiç birisinde biyofilm oluşumu görülmemiştir.

Çizelge 4.3. *E. faecium* suşlarında biyofilm oluşumu

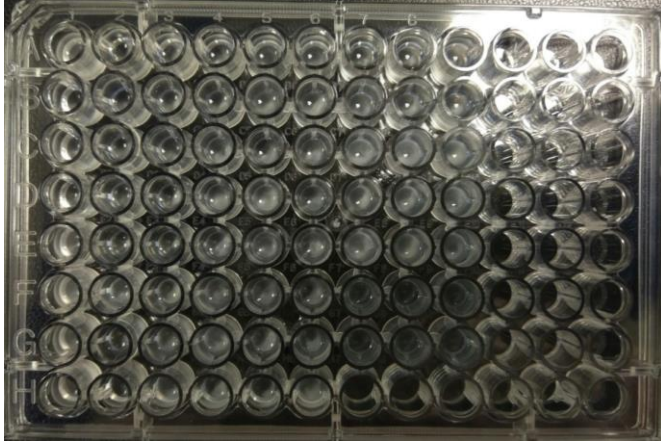
Bakteri	Ort. OD	Nihai OD (Ort. OD – Odc)	Biyofilm oluşumu	
<i>E. faecium</i> RI-5	0,267	0,066	$0,066 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-30	0,274	0,073	$0,073 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-41	0,244	0,043	$0,043 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-46	0,246	0,045	$0,045 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-53	0,280	0,079	$0,079 \leq 0,198$	-
<i>E. faecium</i> RI-55	0,283	0,082	$0,082 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-61	0,280	0,079	$0,079 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-64	0,266	0,065	$0,065 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-68	0,265	0,064	$0,064 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-70	0,288	0,087	$0,087 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-71	0,258	0,057	$0,057 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-74	0,265	0,064	$0,064 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-75	0,276	0,075	$0,075 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-78	0,257	0,056	$0,056 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-79	0,280	0,079	$0,079 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RI-80	0,279	0,078	$0,078 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RT-81	0,269	0,068	$0,068 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RT-82	0,227	0,026	$0,026 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RT-94	0,251	0,050	$0,050 \leq 0,201$	-
<i>E. faecium</i> RT-101	0,245	0,044	$0,044 \leq 0,201$	-
<i>E. faecalis</i> 29212	0,413	0,222	$0,191 < 0,022 \leq 0,382$	+
<i>S. epidermidis</i> 12228	0,215	0,024	$0,024 \leq 0,191$	-

-: biyofilm aktivitesi yok

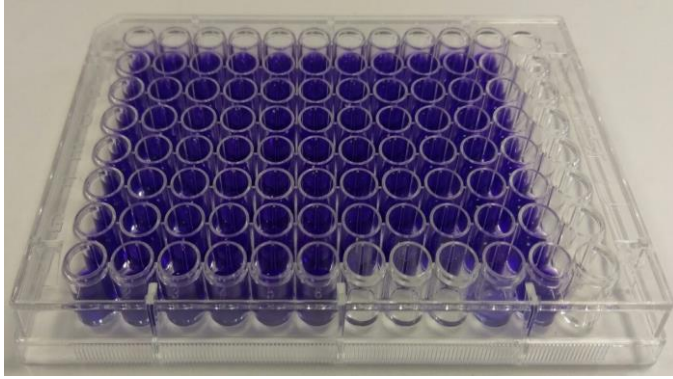
+: zayıf biyofilm aktivitesi



Resim 4.5. Enterokok suşlarının mikropate de üreme aşaması



Resim 4.6. Enterokok suşlarının PBS ile yıkama aşaması



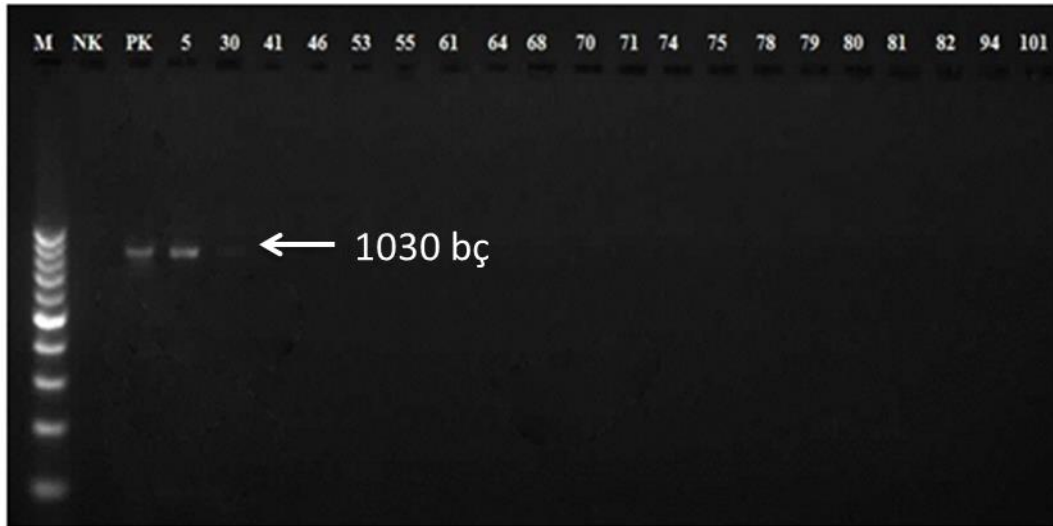
Resim 4.7. Enterokok suşlarının kristal viyole ile boyanma aşaması

4.5. Vankomisin Direnç genlerinin Belirlenmesi (*vanA* ve *vanB*) ve Jel Elektroforez Görüntüleri

Enterokokların güvenilirliğinin belirlenmesinde en önemli göstergelerden biride vankomisin glikopeptit yapısındaki duyarlılıktır. Bu nedenle *vanA* ve *vanB* gen bölgelerine özgü primerler kullanılarak PZR çalışmaları yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılan *E. faecium* DSM 20477 ve *E. faecium* RI-5 suşlarının 1030 bp büyüklüğünde *vanA* direnç geni taşıdığı saptanırken (Çizelge 4.4- 4.12) diğer suşlarda saptanmamıştır. *vanA* direnç geni elektroforez jel görüntüsü Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Fenotipik olarak araştırılan hiçbir suş vankomisin antibiyotiğine direnç göstermemiştir. *vanA* genine ait *E. faecium* RI-5 suşunun DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-1).

Çizelge 4.4. Vankomisin direnç genleri ile ilgili PZR sonuçları

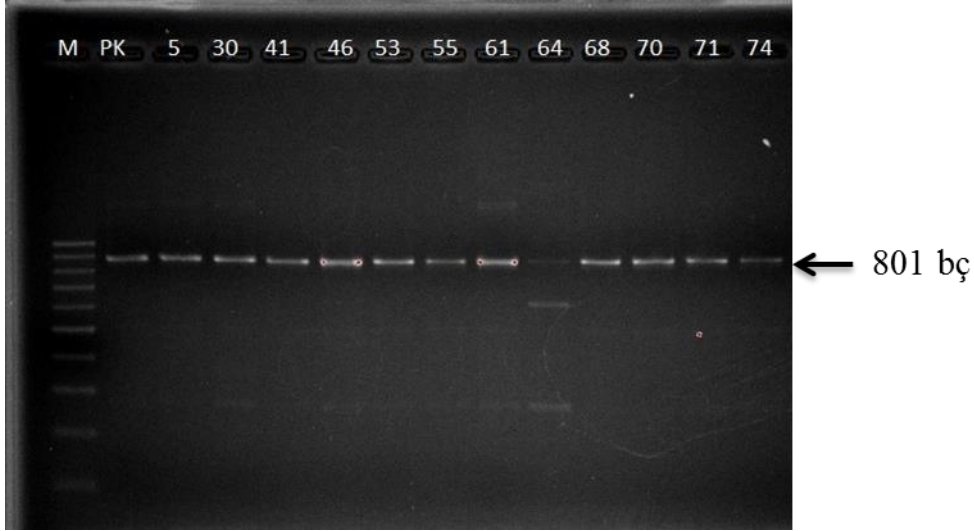
Bakteri	van A	van B
<i>E. faecium</i> RI-5	+	+
<i>E. faecium</i> RI-30	-	+
<i>E. faecium</i> RI-41	-	+
<i>E. faecium</i> RI-46	-	+
<i>E. faecium</i> RI-53	-	+
<i>E. faecium</i> RI-55	-	+
<i>E. faecium</i> RI-61	-	+
<i>E. faecium</i> RI-64	-	+
<i>E. faecium</i> RI-68	-	+
<i>E. faecium</i> RI-70	-	+
<i>E. faecium</i> RI-71	-	+
<i>E. faecium</i> RI-74	-	+
<i>E. faecium</i> RI-75	-	-
<i>E. faecium</i> RI-78	-	-
<i>E. faecium</i> RI-79	-	-
<i>E. faecium</i> RI-80	-	-
<i>E. faecium</i> RT-81	-	-
<i>E. faecium</i> RT-82	-	-
<i>E. faecium</i> RT-94	-	-
<i>E. faecium</i> RT-101	-	-
<i>E. faecium</i> DSM 20477	+	+



Şekil 4.3. *E. faecium* suşlarının Van A geni amplifikasyonu
M: Marker, NK: su, PK: *E. faecium* DSM 20477

E. faecium suşlarının PZR çalışmaları sonucunda 12 suşun (%60) 801 bç büyüklüğünde van B geni taşıdığı saptanmıştır (Çizelge 4.4- 4.12). Fenotipik direnç çalışmaları sonucunda hiçbir suş vankomisin antibiyotikğine direnç göstermemiştir. van B gen bölgesi elektroforez

jel görüntüsü Şekil 4.4’ de gösterilmiştir. *vanB* genine ait *E. faecium* RI-46 suşunun DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-2)



Şekil 4.4. *E. faecium* suşlarının *vanB* geni amplifikasyonu
M; Marker, PK; *E. faecium* DSM 20477

E. faecium RI-5 ve *E. faecium* DSM 20477 suşlarının hem *vanA* hem de *vanB* genlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Vankomisin antibiyotigine direnç ile *vanA* ve *vanB* genleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde fark önemli ($p < 0,05$) bulunmuştur.

4.6. Virülans genlerinin belirlenmesi ve jel elektroforez görüntüleri

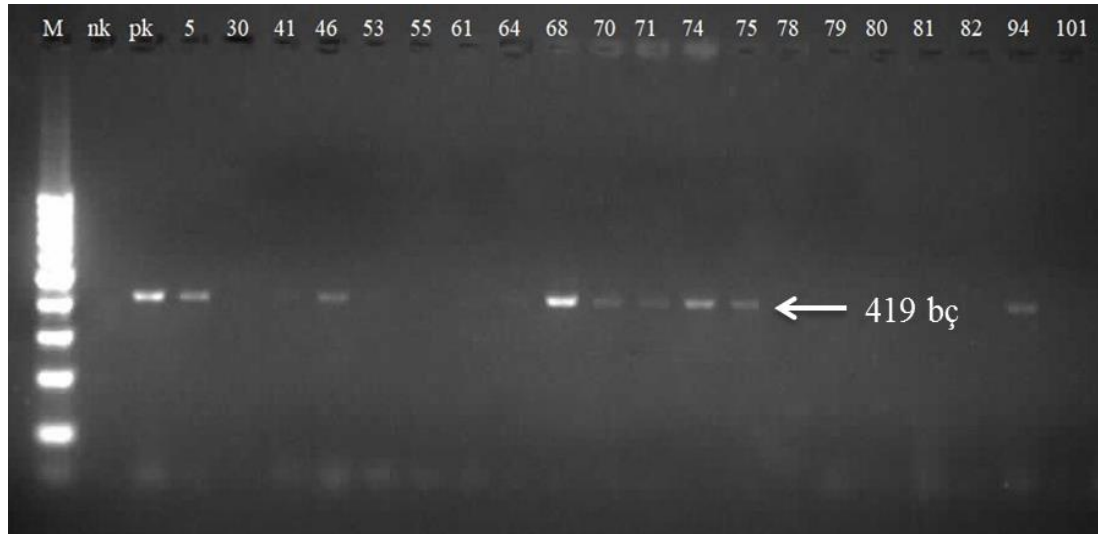
4.6.1. Jelatinaz (*gelE*) gen bölgesi

PZR denemeleri sonucunda *E. faecium* RI-5, RI-46, RI-68, RI-70, RI-71, RI-74, RI-75 ve RT-94 suşlarının jelatinaz (*gelE*) genini içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5- 4.12). *E. faecium* suşları arasında *gelE* geninin bulunma sıklığı %40 olarak saptanmıştır. Enterokok suşlarında *gelE* genine özgül primerlerin kullanıldığı PZR uygulamaları sonucu 419 bp büyüklüğünde ampliconlar elde edilmiştir (Şekil 4.5). *gelE* genine ait *E. faecium* RI-68 ve RT-94 suşlarının DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web

sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-3).

Çizelge 4.5. Jelatinaz (*gelE*) geni PZR sonuçları

Bakteri	<i>gelE</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	+
<i>E. faecium</i> RI-30	-
<i>E. faecium</i> RI-41	-
<i>E. faecium</i> RI-46	+
<i>E. faecium</i> RI-53	-
<i>E. faecium</i> RI-55	-
<i>E. faecium</i> RI-61	-
<i>E. faecium</i> RI-64	-
<i>E. faecium</i> RI-68	+
<i>E. faecium</i> RI-70	+
<i>E. faecium</i> RI-71	+
<i>E. faecium</i> RI-74	+
<i>E. faecium</i> RI-75	+
<i>E. faecium</i> RI-78	-
<i>E. faecium</i> RI-79	-
<i>E. faecium</i> RI-80	-
<i>E. faecium</i> RT-81	-
<i>E. faecium</i> RT-82	-
<i>E. faecium</i> RT-94	+
<i>E. faecium</i> RT-101	-
<i>E. faecium</i> DSM 20477	+



Şekil 4.5. *E. faecium* suşlarının *gelE* geni amplifikasyonu
M: Marker, NK: su, PK; *E. faecium* DSM 20477

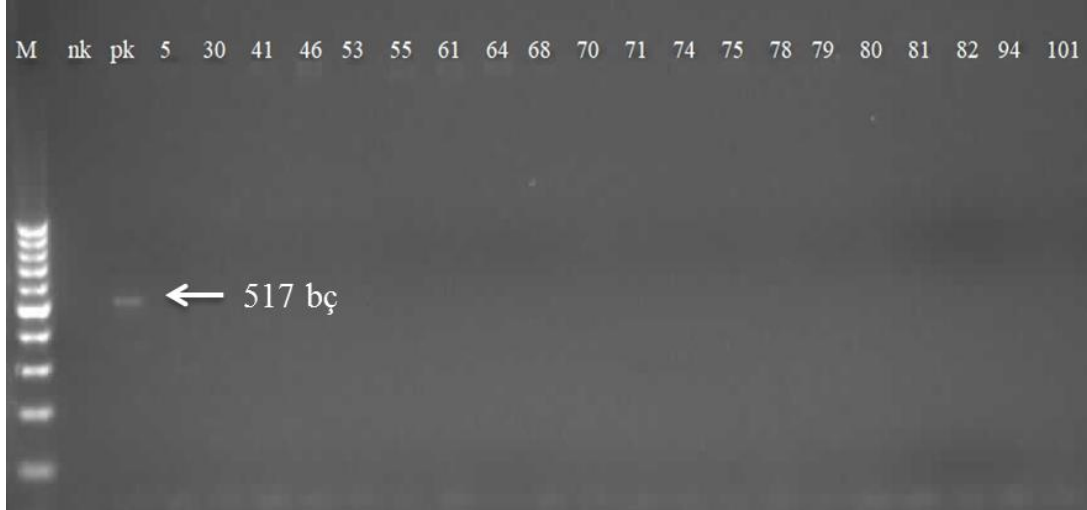
Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *gelE* geni ile biyofilm oluşumu arasındaki fark ($p<0,05$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

4.6.2. Sitolizin (*cylA* ve *cylB*) gen bölgeleri

PZR denemeleri sonucunda sitolizin salgılayan 517 bç büyüklüğünde *cylA* ve 843 bç büyüklüğünde *cylB* gen bölgeleri taranmış ve *E. faecium* DSM 20477 referans suşu hariç diğer suşlarda görülmemiştir (Çizelge 4.6- 4.12). *cylA* gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.6’da, *cylB* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü ise Şekil 4.7’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Sitolizin (*cylA* ve *cylB*) gen bölgeleri PZR sonuçları

Bakteri	<i>cylA</i>	<i>cylB</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	-	-
<i>E. faecium</i> RI-30	-	-
<i>E. faecium</i> RI-41	-	-
<i>E. faecium</i> RI-46	-	-
<i>E. faecium</i> RI-53	-	-
<i>E. faecium</i> RI-55	-	-
<i>E. faecium</i> RI-61	-	-
<i>E. faecium</i> RI-64	-	-
<i>E. faecium</i> RI-68	-	-
<i>E. faecium</i> RI-70	-	-
<i>E. faecium</i> RI-71	-	-
<i>E. faecium</i> RI-74	-	-
<i>E. faecium</i> RI-75	-	-
<i>E. faecium</i> RI-78	-	-
<i>E. faecium</i> RI-79	-	-
<i>E. faecium</i> RI-80	-	-
<i>E. faecium</i> RT-81	-	-
<i>E. faecium</i> RT-82	-	-
<i>E. faecium</i> RT-94	-	-
<i>E. faecium</i> RT-101	-	-
<i>E. faecium</i> DSM 20477	+	+



Şekil 4.6. *E. faecium* suşlarının *cylA* geni amplifikasyonu
M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSM 20477



Şekil 4.7. *E. faecium* suşlarının *cylB* geni amplifikasyonu
M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSMZ 20447

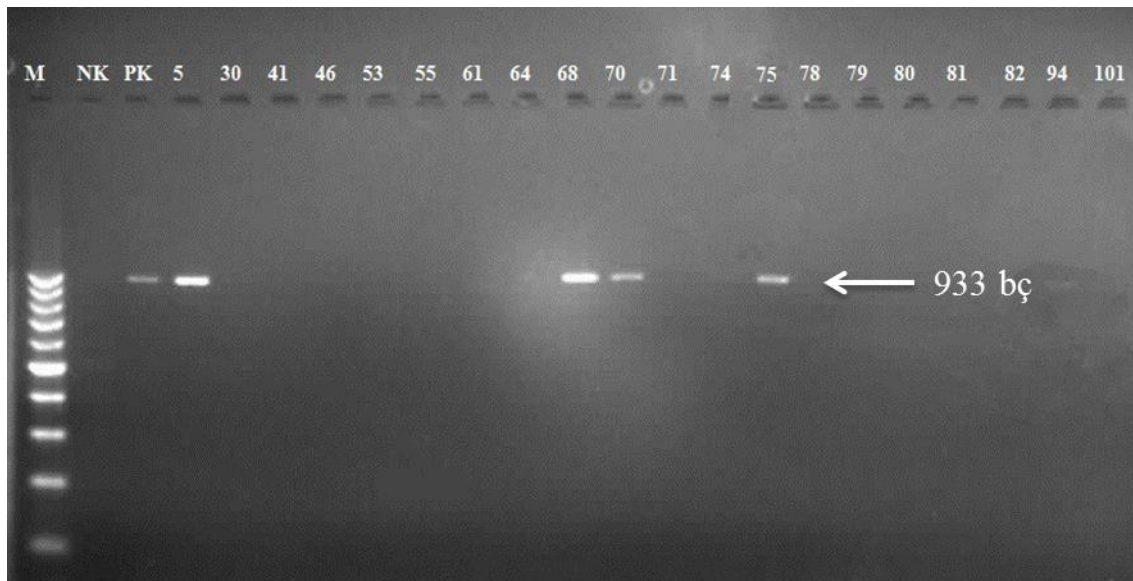
4.6.3. Enterokokkal yüzey proteini (*esp*) gen bölgesi

PZR çalışmaları sonucunda 933 bç büyüklüğünde olan *esp* gen bölgesi *E. faecium* RI-5, RI-68, RI-70, RI-75 ve pozitif kontrol *E. faecium* DSM 20477 suşlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.7- 4.12). Enterokokkal yüzey proteini (*esp*) geni bulunma sıklığı %20 olarak saptanmıştır. Enterokokkal yüzey proteini (*esp*) gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.8’da gösterilmiştir. *esp* genine ait *E. faecium* RI-70 suşunun DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-4).

Çizelge 4.7. Enterokokkal yüzey proteini (*esp*) gen bölgesi PZR sonuçları

Bakteri	<i>esp</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	+
<i>E. faecium</i> RI-30	-
<i>E. faecium</i> RI-41	-
<i>E. faecium</i> RI-46	-
<i>E. faecium</i> RI-53	-
<i>E. faecium</i> RI-55	-
<i>E. faecium</i> RI-61	-
<i>E. faecium</i> RI-64	-
<i>E. faecium</i> RI-68	+
<i>E. faecium</i> RI-70	+
<i>E. faecium</i> RI-71	-
<i>E. faecium</i> RI-74	-
<i>E. faecium</i> RI-75	+
<i>E. faecium</i> RI-78	-
<i>E. faecium</i> RI-79	-
<i>E. faecium</i> RI-80	-
<i>E. faecium</i> RT-81	-
<i>E. faecium</i> RT-82	-
<i>E. faecium</i> RT-94	-
<i>E. faecium</i> RT-101	-
<i>E. faecium</i> DSM 20477	+



Şekil 4.8. *E. faecium* suşlarının *esp* geni amplifikasyonu
M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSM 20477

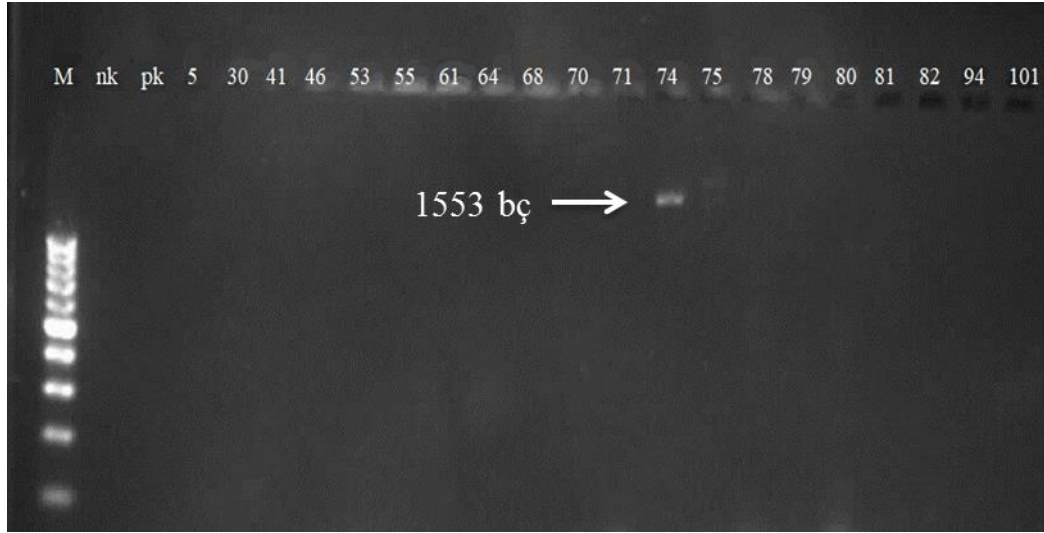
Yapılan istatistiksel analiz sonucunda *esp* ile biyofilm arasındaki fark ($p<0,05$) önemli bulunmuştur.

4.6.4. Hücre agregasyon ve konjugasyon (*agg*) ile agregasyon faktörü (*asa1*) gen bölgeleri

Agregasyon maddelerinden 1553 bp büyüklüğünde olan *agg* gen bölgesi 20 suştan yalnızca *E. faecium* RI-75 suşunda, 375 bp büyüklüğündeki *asa1* gen bölgesi ise *E. faecium* RI-46, RI-68, RI-74, RT-94 suşlarında tespit edilmiş (Çizelge 4.8- 4.12) ve bulunma sıklığı %20 olarak saptanmıştır. *agg* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.9’de, *asa1* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.10’de gösterilmiştir. *agg* genine ait *E. faecium* RI-74 ve *asa1* genine ait *E. faecium* RT-94 suşlarının DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-5).

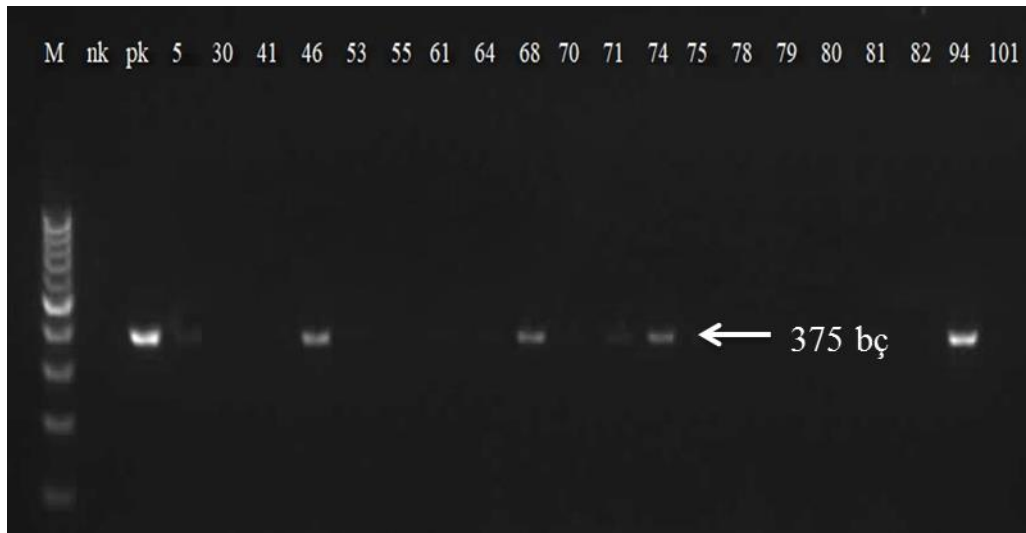
Çizelge 4.8 Hücre agregasyon ve konjugasyon (*agg* ve *asa1*) gen bölgeleri PZR sonuçları

Bakteri	<i>agg</i>	<i>Asa1</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	-	-
<i>E. faecium</i> RI-30	-	-
<i>E. faecium</i> RI-41	-	-
<i>E. faecium</i> RI-46	-	+
<i>E. faecium</i> RI-53	-	-
<i>E. faecium</i> RI-55	-	-
<i>E. faecium</i> RI-61	-	-
<i>E. faecium</i> RI-64	-	-
<i>E. faecium</i> RI-68	-	+
<i>E. faecium</i> RI-70	-	-
<i>E. faecium</i> RI-71	-	-
<i>E. faecium</i> RI-74	+	+
<i>E. faecium</i> RI-75	-	-
<i>E. faecium</i> RI-78	-	-
<i>E. faecium</i> RI-79	-	-
<i>E. faecium</i> RI-80	-	-
<i>E. faecium</i> RT-81	-	-
<i>E. faecium</i> RT-82	-	-
<i>E. faecium</i> RT-94	-	+
<i>E. faecium</i> RT-101	-	-
<i>E. faecium</i> DSM 20477	-	+



Şekil 4.9. *E. faecium* suşlarının *agg* geni amplifikasyonu

M: Marker, NK: su, PK: *E. faecium* DSM 20477



Şekil 4.10. *E. faecium* suşlarının *asa1* geni amplifikasyonu

M: Marker, NK: su, PK: *E. faecium* DSM 20477

asa1 geni ile biyofilm aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ($P < 0,05$) arasındaki fark önemli bulunmuştur.

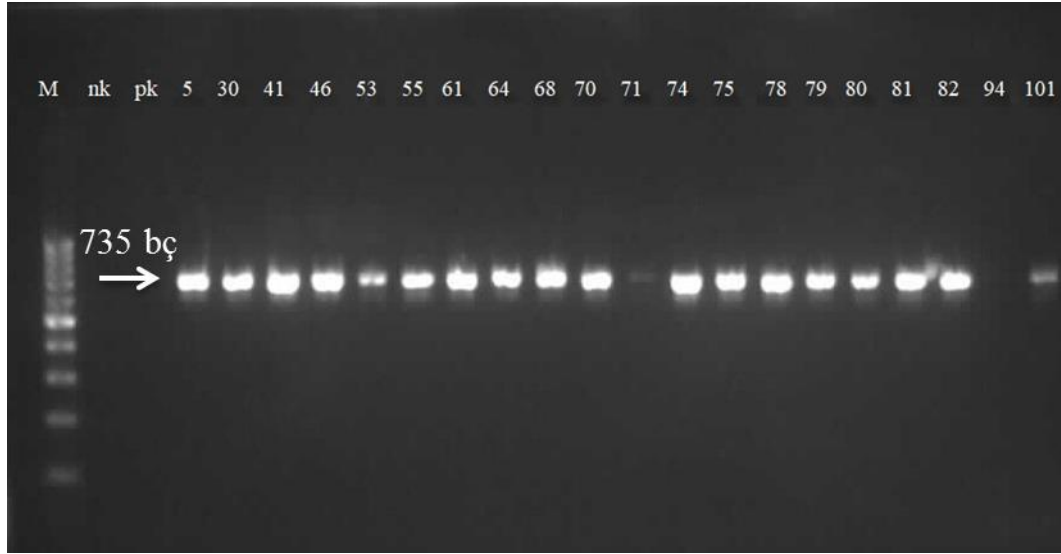
4.6.5. Enterokokkal yüzey antijeni A (*efaAfm*) gen bölgesi

PZR uygulamaları sonucunda 1 suş hariç (RT-94) diğer suşlarda *efaAfm* geni görülmüştür (Çizelge 4.9- 4.12) ve *efaAfm* geni bulunma sıklığı %95 olarak tespit edilmiştir. Enterokok suşlarında *efaAfm* genine özgül primerlerin kullanıldığı PZR uygulamaları sonucu 735 bp

büyükliğünde ampikonlar elde edilmiştir. *efaAfm* gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.11’te gösterilmiştir. *efaAfm* gen bölgesine ait DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-6). Pozitif kontrol olarak kullanılan referans suşta (DSM 20477) *efaAfm* geni tespit edilmemiştir.

Çizelge 4.9 Enterokokkal yüzey antijeni A (*efaAfm*) gen bölgesi PZR sonuçları

Bakteri	<i>efaAfm</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	+
<i>E. faecium</i> RI-30	+
<i>E. faecium</i> RI-41	+
<i>E. faecium</i> RI-46	+
<i>E. faecium</i> RI-53	+
<i>E. faecium</i> RI-55	+
<i>E. faecium</i> RI-61	+
<i>E. faecium</i> RI-64	+
<i>E. faecium</i> RI-68	+
<i>E. faecium</i> RI-70	+
<i>E. faecium</i> RI-71	+
<i>E. faecium</i> RI-74	+
<i>E. faecium</i> RI-75	+
<i>E. faecium</i> RI-78	+
<i>E. faecium</i> RI-79	+
<i>E. faecium</i> RI-80	+
<i>E. faecium</i> RT-81	+
<i>E. faecium</i> RT-82	+
<i>E. faecium</i> RT-94	-
<i>E. faecium</i> RT-101	+
<i>E. faecium</i> DSM 20477	-



Şekil 4.11. *E. faecium* suşlarının *efaAfm* geni amplifikasyonu
M; Marker, NK; su, PK; *E. faecium* DSM 20477

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, *gelE* geni ile biyofilm oluşumu arasındaki fark ($p < 0,05$) önemli bulunmuştur.

4.6.6. Seks feromon determinantı (*cob*, *ccf*) gen bölgeleri

Seks feromon determinantlarından 494 bp büyüklüğünde *cob* gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.12’ de gösterilmiştir. 20 *Enterococcus* suşlarından 3 tanesi (RI-68, RI-70, RI-101) hariç hepsinde *cob* gen bölgesi bulunmuştur (Çizelge 4.10- 4.12). *cob* geninin bulunma sıklığı % 85 olarak saptanmıştır. *cob* genine ait *E. faecium* RT-94 suşunun DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-7).

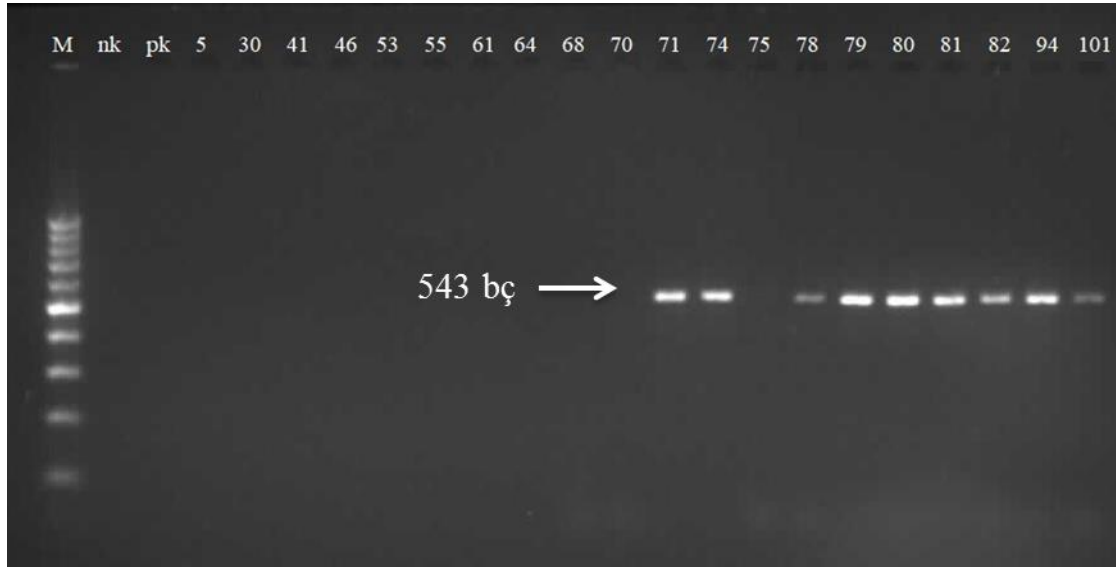
Çizelge 4.10. Seks feromon determinantı (*cob*, *ccf*) gen bölgeleri PZR sonuçları

Bakteri	<i>cob</i>	<i>ccf</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	+	-
<i>E. faecium</i> RI-30	+	-
<i>E. faecium</i> RI-41	+	-
<i>E. faecium</i> RI-46	+	-
<i>E. faecium</i> RI-53	+	-
<i>E. faecium</i> RI-55	+	-
<i>E. faecium</i> RI-61	+	-
<i>E. faecium</i> RI-64	+	-
<i>E. faecium</i> RI-68	-	-
<i>E. faecium</i> RI-70	-	-
<i>E. faecium</i> RI-71	+	+
<i>E. faecium</i> RI-74	+	+
<i>E. faecium</i> RI-75	+	-
<i>E. faecium</i> RI-78	+	+
<i>E. faecium</i> RI-79	+	+
<i>E. faecium</i> RI-80	+	+
<i>E. faecium</i> RT-81	+	+
<i>E. faecium</i> RT-82	+	+
<i>E. faecium</i> RT-94	+	+
<i>E. faecium</i> RT-101	-	+
<i>E. faecium</i> DSM 20477	+	-

Şekil 4.12. *E. faecium* suşlarının *cob* geni amplifikasyonu
M: Marker, NK: su, PK: *E. faecium* DSM 20447

Seks feromon determinantlarından 543 bp büyüklüğünde olan *ccf* gen bölgesinin PZR denemeleri sonucunda (Şekil 4.13) *E. faecium* suşları arasında bulunma sıklığı %45 olarak saptanmıştır. *ccf* gen bölgesi *E. faecium* RI-71, RI-74, RI-78, RI-79, RI-80, RT-81, RT-82, RT-94, RT-101 suşlarında tespit edilirken, pozitif kontrol olan *E. faecium* DSM 20477

suşunda tespit edilmemiştir (Çizelge 4.10- 4.12). *ccf* genine ait *E. faecium* RI-80 suşunun DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13, EK-8).



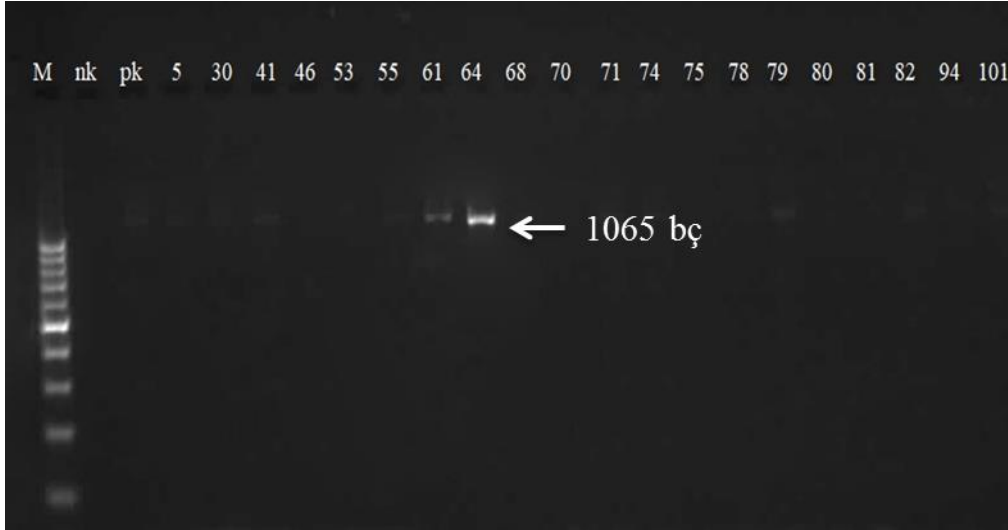
Şekil 4.13. *E. faecium* suşlarının *ccf* geni amplifikasyonu
M: Marker, NK: su, PK: *E. faecium* DSM 20477

4.6.7. Hiyaluronidaz (*hyl*) gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü

PZR çalışmaları sonucunda 1065 bp büyüklüğünde olan *hyl* gen bölgesi sadece *E. faecium* RI-61 ve RI-64 suşlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.11- 4.12). *hyl* gen bölgesinin bulunma sıklığı %20 olarak saptanmış ve gen bölgesine ait jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.14' de gösterilmiştir. *hyl* gen bölgesine ait *E. faecium* RI-64 suşunun DNA dizi analizi National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.13-EK-9).

Çizelge 4.11 Hiyaluronidaz (*hyl*) gen bölgesi PZR sonuçları

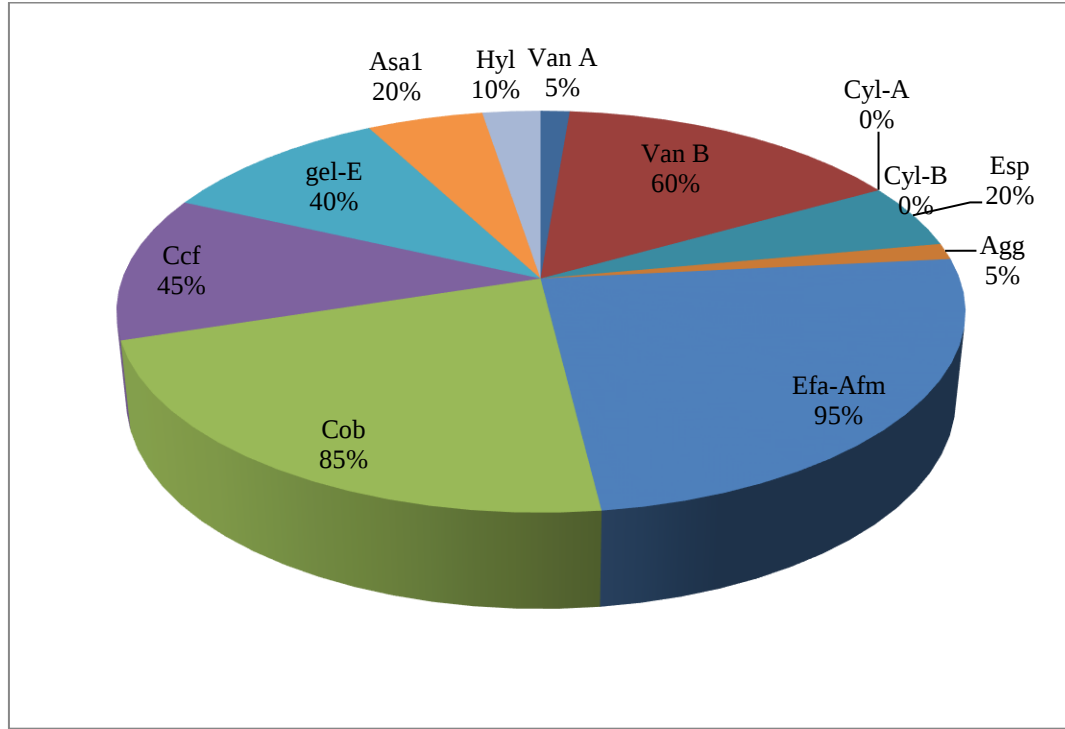
Bakteri	<i>hyl</i>
<i>E. faecium</i> RI-5	-
<i>E. faecium</i> RI-30	-
<i>E. faecium</i> RI-41	-
<i>E. faecium</i> RI-46	-
<i>E. faecium</i> RI-53	-
<i>E. faecium</i> RI-55	-
<i>E. faecium</i> RI-61	+
<i>E. faecium</i> RI-64	+
<i>E. faecium</i> RI-68	-
<i>E. faecium</i> RI-70	-
<i>E. faecium</i> RI-71	-
<i>E. faecium</i> RI-74	-
<i>E. faecium</i> RI-75	-
<i>E. faecium</i> RI-78	-
<i>E. faecium</i> RI-79	-
<i>E. faecium</i> RI-80	-
<i>E. faecium</i> RT-81	-
<i>E. faecium</i> RT-82	-
<i>E. faecium</i> RT-94	-
<i>E. faecium</i> RT-101	-
<i>E. faecium</i> DSM 20477	-



Şekil 4.14. *E. faecium* suşlarının *hyl* geni amplifikasyonu
M: Marker, NK: su, PK: *E. faecium* DSM 20477

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, 20 *E. faecium* bakterisinde en çok bulunan gen bölgelerinin *E. faecium* yüzey antijeni A (*efaAfm*) (%95) ve seks feromon determinantı (*cob*) (%85) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

Bakterilerin içerdikleri vankomisin direnç genleri ve virülans genleri değerlendirildiğine ise; *E. faecium* RI-74 suşunun 7 gen bölgesi (*vanB*, *agg*, *efaAfm*, *cob*, *ccf*, *gelE*, *asa1*) ile en çok gen bölgesine sahip iken *E. faecium* RT-101 suşunun 2 gen bölgesi (*efaAfm*, *ccf*) ile en az gen bölgesine sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.15. *E. faecium* suşlarının virülans gen bölgeleri yüzde dağılımı

Çizelge 4.12. *E. faecium* suşların taşıdıkları direnç ve virülans genler

Suşlar	Taşıdığı virülans ve direnç genleri (sayısı)
<i>E. faecium</i> RI-5	<i>vanA, vanB, esp, efaAfm, cob, gelE</i> (6)
<i>E. faecium</i> RI-30	<i>vanB, efaAfm, cob</i> (3)
<i>E. faecium</i> RI-41	<i>vanB, efaAfm, cob</i> (3)
<i>E. faecium</i> RI-46	<i>vanB, efaAfm, cob, gelE, asa1</i> (5)
<i>E. faecium</i> RI-53	<i>vanB, efaAfm, cob</i> (3)
<i>E. faecium</i> RI-55	<i>vanB, efaAfm, cob</i> (3)
<i>E. faecium</i> RI-61	<i>vanB, efaAfm, cob, hyl</i> (4)
<i>E. faecium</i> RI-64	<i>vanB, efaAfm, cob, hyl</i> (4)
<i>E. faecium</i> RI-68	<i>vanB, esp, efaAfm, gelE, asa1</i> (5)
<i>E. faecium</i> RI-70	<i>vanB, esp, efaAfm, gelE</i> (4)
<i>E. faecium</i> RI-71	<i>vanB, efaAfm, cob, ccf, gelE</i> (5)
<i>E. faecium</i> RI-74	<i>vanB, agg, efaAfm, cob, ccf, gelE, asa1</i> (7)
<i>E. faecium</i> RI-75	<i>Esp, efaAfm, cob, gelE</i> (4)
<i>E. faecium</i> RI-78	<i>efaAfm, cob, ccf</i> (3)
<i>E. faecium</i> RI-79	<i>efaAfm, cob, ccf</i> (3)
<i>E. faecium</i> RI-80	<i>efaAfm, cob, ccf</i> (3)
<i>E. faecium</i> RT-81	<i>efaAfm, cob, ccf</i> (3)
<i>E. faecium</i> RT-82	<i>efaAfm, cob, ccf</i> (3)
<i>E. faecium</i> RT-94	<i>cob, ccf, gelE, asa1</i> (4)
<i>E. faecium</i> RT-101	<i>efaAfm, ccf</i> (2)
<i>E. faecium</i> DSM 20477	<i>vanA, vanB, clyA, clyB, esp, cob, gelE, asa1</i> (8)

4.7. DNA Dizi Analizi

E. faecium türü bakterilerde vankomisin direnç (*vanA, vanB*) ve virülans genlerin (*gelE, esp, agg, asa1, efaAfm, cob, ccf* ve *hyl*) varlığını belirlemek için, uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılan DNA’lardan *vanA* gen bölgesi için *E. faecium* RI-5, *vanB* gen bölgesi için *E. faecium* RI-46, *gelE* gen bölgesi için *E. faecium* RI-68 ve RT-94, *agg* gen bölgesi için *E. faecium* RI-74, *asa1* gen bölgesi için *E. faecium* RT-94, *efaAfm* gen bölgesi için *E. faecium* RI-41 ve RT-101, *cob* gen bölgesi için *E. faecium* RT-94, *ccf* gen bölgesi için, *E. faecium* RI-80 ve *hyl* gen bölgesi için *E. faecium* RI-64 suşları her bir gen bölgesinden bir suş olacak şekilde tesadüfen seçilerek dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen direnç ve virülans genlere ait dizi analizi sonuçları gen bankalarıyla karşılaştırılarak PZR ürünleri doğrulanmıştır. Dizi analizlerini karşılaştırmak amacıyla National Center of Biotechnology Information’ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı kullanılmıştır. Dizi analizine ait blast sonuçları Çizelge 4.13’de verilmiştir.

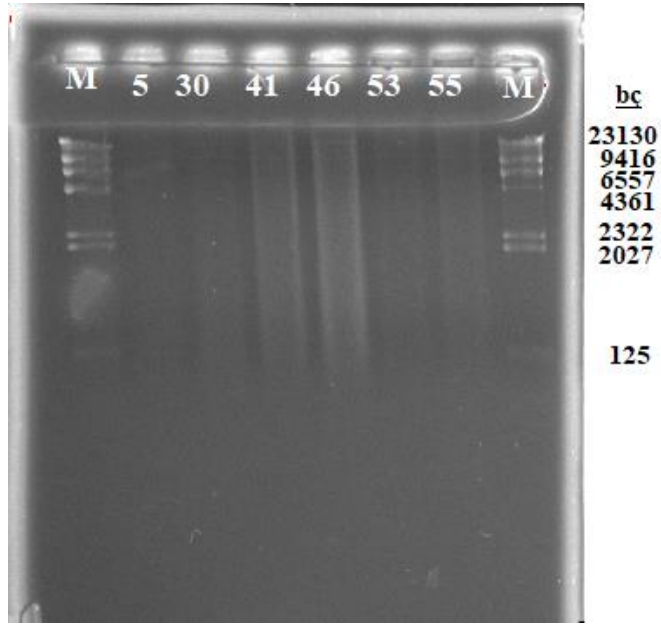
Çizelge 4.13. DNA dizi analizi BLAST sonuçları

Gen bölgesi	Bakteri	Blast Sonuçları					
		Tanımlama	Maksimum skor	Toplam skor	Sorgu sonucu	E değeri	Erişim numarası
vanA	RI-5	Enterococcus faecium strain LAC7.2 chromosome, complete genome	1329	1726	96%	0.0	CP045012.1
		Enterococcus faecium strain V2937 chromosome, complete genome	1329	1726	96%	0.0	CP044274.1
		Enterococcus faecium strain 515 chromosome, complete genome	1329	1726	96%	0.0	CP041257.1
		Enterococcus faecium isolate E8481 genome assembly, chromosome: 1	1329	1726	96%	0.0	LR536670.1
		Enterococcus faecium isolate E7196 genome assembly, plasmid: 1	1329	1726	96%	0.0	LR135270.1
vanB	RI-46	Enterococcus faecium isolate E1334 genome assembly, chromosome: 1	1480	1480	97%	0.0	LR134095.1
		Enterococcus faecium isolate E4239 genome assembly, chromosome: 1	1480	1480	97%	0.0	LR135782.1
		Enterococcus faecium NRRL B-2354, complete genome	1480	1480	97%	0.0	CP004063.1
		Enterococcus faecium strain FDAARGOS_323 chromosome, complete genome	1480	1480	97%	0.0	CP027402.1
		Enterococcus sp. DA9 chromosome, complete genome	1480	1480	97%	0.0	CP042839.1
gelE	RT-94	Enterococcus faecalis strain MD4 gelatinase (gelE) gene, partial cds	656	656	100%	0.0	MH720045.1
		Enterococcus faecalis strain CVM N48037F chromosome, complete genome	656	656	100%	0.0	CP028720.1
		Enterococcus faecalis strain C25 chromosome, complete genome	651	651	100%	0.0	CP030042.1
		Enterococcus faecalis KUB3007 DNA, complete genome	656	656	99%	0.0	AP018543.1
		Enterococcus faecalis strain LN68 Fsr and gelE-sprE operons, complete sequence	656	656	100%	0.0	JN246675.1
	RI-68	Enterococcus faecalis strain L15 chromosome, complete genome	696	696	98%	0.0	CP042213.1
		Enterococcus faecalis strain 4928STDY7071355 genome assembly, chromosome: 1	696	696	98%	0.0	LR607334.1
		Enterococcus faecalis strain MD4 gelatinase (gelE) gene, partial cds	696	696	98%	0.0	MH720045.1
		Enterococcus faecalis KUB3007 DNA, complete genome	696	696	98%	0.0	AP018543.1
esp	RI-70	Enterococcus faecium strain QSE32 fsr operon, complete sequence; and GelE (gelE) and SprE (sprE) genes, complete cds	1480	1480	97%	0.0	CP042839.1
		Enterococcus faecalis strain NCTC8732 genome assembly, chromosome: 1	1648	1648	98%	0.0	LR594051.1
		Enterococcus faecalis strain FDAARGOS_324 chromosome, complete genome	1648	1648	98%	0.0	CP028285.1
		Enterococcus faecalis strain LD33, complete genome	1648	1648	98%	0.0	CP014949.1
		Enterococcus faecium strain V2937 chromosome, complete genome	1502	1502	99%	0.0	CP044274.1
Agg	RI-74	Enterococcus faecium isolate E6020 genome assembly, chromosome: 1	1502	1502	99%	0.0	LR536640.1
		Enterococcus faecalis strain DD14 genome	1816	1816	92%	0.0	CP021161.1
		Enterococcus faecalis V583 chromosome, complete genome	1790	2790	91%	0.0	AE016830.1
		Enterococcus faecium plasmid pHKK701 aggregation substance (ash701) gene, complete cds	1607	1607	91%	0.0	U91527.1
Asa1	RT-94	Enterococcus faecalis strain DPN94 aggregation substance protein (asp1) gene, partial cds	996	996	73%	0.0	KU311662.1
		Enterococcus faecalis strain CK135 plasmid pPD1, complete sequence	580	580	98%	1e-161	KT290268.1
		E.faecalis plasmid pPD1 asp1 and URFs pd57, pd125 and pd113 genes	588	588	99%	6e-164	X62656.1
		Enterococcus faecalis strain CVM N48037F chromosome, complete genome	582	582	98%	3e-162	CP028720.1
		Enterococcus faecalis strain 12.8a aggregation substance protein (asa1) gene, partial cds	575	575	97%	5e-160	KT598461.1
		Enterococcus faecalis strain VE14089 chromosome, complete genome	566	1082	98%	3e-157	CP039296.1

Gen bölgesi	Bakteri	Blast Sonuçları					
		Tanımlama	Maksimum skor	Toplam skor	Sorgu sonucu	E değeri	Erişim numarası
<i>efaAfm</i>	RI-41	<u>Enterococcus faecium isolate E0139 genome assembly, chromosome: 1</u>	1212	1212	98%	0.0	<u>LR132067.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain NCTC7174 genome assembly, chromosome: 1</u>	1212	1212	98%	0.0	<u>LR134337.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain V1836 chromosome, complete genome</u>	1206	1206	98%	0.0	<u>CP044264.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain VVEswe-R chromosome, complete genome</u>	1206	1206	98%	0.0	<u>CP041261.1</u>
		<u>Enterococcus faecium QU 50 DNA, complete genome</u>	1206	1206	98%	0.0	<u>AP019394.1</u>
	RT-101	<u>Enterococcus faecium isolate E0139 genome assembly, chromosome: 1</u>	1242	1242	97%	0.0	<u>LR132067.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain LAC7.2 chromosome, complete genome</u>	1236	1236	97%	0.0	<u>CP045012.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain 515 chromosome, complete genome</u>	1236	1236	97%	0.0	<u>CP041257.1</u>
		<u>Enterococcus faecium QU 50 DNA, complete genome</u>	1236	1236	97%	0.0	<u>AP019394.1</u>
		<u>Enterococcus faecium isolate E7196 genome assembly, plasmid: 1</u>	1236	1236	97%	0.0	<u>LR135270.1</u>
<i>cob</i>	RT-94	<u>Enterococcus faecium strain N56454 chromosome, complete genome</u>	944	944	96%	0.0	<u>CP040904.1</u>
		<u>Enterococcus faecium isolate E2079 genome assembly, chromosome: 1</u>	944	944	96%	0.0	<u>LR135169.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain RBWH1 chromosome, complete genome</u>	944	944	96%	0.0	<u>CP033206.1</u>
		<u>Enterococcus faecium isolate E7196 genome assembly, plasmid: 1</u>	938	938	96%	0.0	<u>LR135270.1</u>
		<u>Enterococcus faecium QU 50 DNA, complete genome</u>	938	938	96%	0.0	<u>AP019394.1</u>
<i>ccf</i>	RI-80	<u>Enterococcus faecium strain V2937 chromosome, complete genome</u>	593	593	94%	2e-165	<u>CP044274.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain 4928STDY7071735 genome assembly, chromosome: 1</u>	593	593	94%	2e-165	<u>LR607355.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain 515 chromosome, complete genome</u>	593	593	94%	2e-165	<u>CP041257.1</u>
		<u>Enterococcus faecium QU 50 DNA, complete genome</u>	593	593	94%	2e-165	<u>AP019394.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain JE1 chromosome, complete genome</u>	593	593	94%	2e-165	<u>CP033041.1</u>
<i>hyl</i>	RI-64	<u>Enterococcus faecium strain DMEA02 chromosome, complete genome</u>	693	693	92%	0.0	<u>CP043484.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain FA3 chromosome, complete genome</u>	693	693	92%	0.0	<u>CP042834.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain CBA7134 chromosome, complete genome</u>	693	693	92%	0.0	<u>CP025685.1</u>
		<u>Enterococcus faecium strain HB-1 chromosome, complete genome</u>	693	693	92%	0.0	<u>CP040878.1</u>
		<u>Enterococcus faecium T110, complete genome</u>	654	654	92%	0.0	<u>CP006030.1</u>

4.8. Plazmid DNA izolasyonu

20 *E. faecium* bakterisinden, yapılan çalışmalar sonucunda, hiçbirisinde plazmid DNA'ya rastlanılmamıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *E. faecium* suşlarının plazmid DNA jel görüntüsü

5. TARTIŞMA

Enterokoklar, laktik asit bakterileri (LAB) cinsine ait olan insanların, memelilerin ve diğer hayvanların gastrointestinal yollarının bağırsaklarında ortak mikrobiyota olarak bulunan bakterilerdir. Bunun yanı sıra birçok olumsuz çevresel koşullarında hayatta kalabilmeleri ve organoleptik özelliklere sahip çeşitli geleneksel fermente gıdaların üretiminde önemli bir rol oynadıkları için hayvansal ve bitkisel kökenli birçok gıda da bulunurlar. Enterokoklar, laktik asit ve bakteriyosinler (enteroksinler) gibi bakteri öldürücü madde ürettikleri için gıda maddelerinin biyolojik olarak korunmasında da kullanılmaktadırlar. *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* ve *Clostridium botulinum* dâhil olmak üzere birçok önemli Gram-pozitif gıda kaynaklı patojene karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Enterokoklar aynı zamanda insanlar ve hayvanlar için probiyotik olarak kullanılmaktadırlar ancak yatay gen transferi yoluyla virülans ve antibiyotik direnç genleri edinme yeteneklerinin, probiyotik olarak veya yiyeceklerde starter/yardımcı kültür olarak kullanılmasının önündeki önemli bir engel olarak düşünülmektedir (Foulquie Moreno ve ark., 2006; Franz ve ark., 2011; Reis ve ark., 2012; Jaouani ve ark., 2015; Golob ve ark., 2019)

Enterokoklar genellikle ürogenital sistem enfeksiyonları (Protonotariou ve ark., 2010) ve endokardit (Heikans ve ark., 2007) gibi patogeneze ile ilişkilendirilmektedir. Probiyotik bakterilerde istenmeyen fenotipler olan hemolizin (Franz ve ark., 2001), jelatinaz (Huycke ve ark., 1991) ve agregasyon maddesi (Sartingen ve ark., 2000) üretiminden sorumlu antibiyotik direnç genlerini taşıyabilmektedirler. İnsanlarda bir hastalığın başlangıcında veya hastalık semptomlarının alevlenmesinde rol oynayabilecek birçok enterokok virülans geni tanımlanmıştır (Anderson ve ark., 2016). Bu determinantların çoğu gıdalardan izole edilen suşlarda bulunmuştur (Eaton ve Gasson, 2001; Franz ve ark., 2003). En önemli enterokok virülans determinantları, agregasyon maddesi (*asa1*), jelatinaz (*gelE*), sitolisin (*cylA*, *cylB*), enterokok yüzey proteini (*esp*), hiyalüronidaz (*hyl*), endokardit antijeni (*efaA*) içerir (Barbosa ve ark., 2010; Ferguson ve ark., 2016). Vankomisin direnç ve virülans genlere sahip olabilme özelliklerinden dolayı enterokokların, gıda veya biyofarmasötik endüstrisinde probiyotik veya başlangıç kültürü olarak kullanılmadan önce enterokokların güvenilirliğinin belirlenmesi gerekmektedir.

Bu amaçla bu tez çalışmasında daha önce probiyotik özellikleri belirlenen *E. faecium* suşlarının potansiyel probiyotik adaylar olarak önerilebilmesi için, vankomisin direnç ve bazı virülans genleri araştırılmıştır. Spesifik primerler aracılığı ile polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak vankomisin direnç (*vanA*, *vanB*) ve 10 farklı virülans gen bölgesi (*gelE*, *cylA*, *cylB*, *esp*, *agg*, *asa1*, *efaAfm*, *cob*, *ccf*, *hyl*) araştırılmıştır. Fenotipik olarak hemolizin ve jelatinaz aktivitesi, mikroplate yöntemiyle biyofilm aktivitesi belirlenmiştir. Aynı zamanda suşların virülans direnç geni transferinde önemli rol oynayan plazmid varlığında tespit edilmiştir.

Enterokoklar birçok antimikrobiyallere doğal olarak dirençli veya toleranslıdır ve yatay gen aktarımı yoluyla yüksek seviye ilaç direncini kolayca alırlar. *E. faecium*'un doğal direnci sefalosporinler, aminoglikozitler (düşük seviye direnci), makrolidler ve sülfonamidleri içerir (EUCAST, 2016). Ayrıca, bazı enterokoklar kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin ve vankomisine dışsal direnç genleri taşıyabilir. Bu genler plazmidlerin üzerinde veya transpozonların yakınında bulunur. Bu nedenle enfeksiyonlarını potansiyel olarak tedavi edilemez hale getiren potansiyel patojenik bakterilere aktarılabilir (Ouweland ve ark., 2016). Ayrıca, enterokoklar insan enfeksiyonlarında kullanılan hemen hemen tüm antimikrobiyallere karşı direnç potansiyeli göstermektedir (Hollenbeck ve Rice, 2012).

Antibiyotikler çoğu hastalığa karşı etkili olma eğilimindedir, ancak gereksiz antibiyotik kullanımı patojen bakteriler arasında direncin artmasına neden olmaktadır (Ouweland ve ark., 2016). Probiyotiklerin, özellikle antibiyotik direncinin yayılmasına katkıda bulunmaması ve aktarılabilir antibiyotik direncini taşıyamaması için özel olarak seçilmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu çalışmada 20 *E. faecium* bakterisinin farklı etki mekanizmasına sahip 10 antibiyotiğe duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir. *E. faecium* suşları, aminoglikozid grubuna dahil olan, bakterilerde protein sentezi inhibitörü olan gentamisin antibiyotiğine ve bakterilerde sitoplazma membran permalitesini bozan polimiksin B antibiyotiğine karşı %100 direnç gösterdiği belirlenirken, hücre duvar sentezini bozan penisilin, ampicilin ve vankomisine %100 duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bakterilerde nükleik asit sentezini bozan kloromfenikole %100 duyarlı iken, rifampisine %81, ofloksasine %52 dirençlilik göstermiştir. Ribozomlarda protein sentezi inhibitörü olan tetrasikline ise %95 duyarlılık göstermiştir. Bouymajane ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada 150 çiğ inek sütü örneğinden izole ettikleri 11 *E. faecalis*,

3 *E. faecium*, 2 *E. durans* ve 1 *E. hirae* suşlarının hepsinin ampisilin ve tetrasikline dirençli, *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının tamamının vankomisin ve gentamisine duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Yerlikaya ve Akbulut (2019) probiyotik *Enterococcus faecium* suşları ile yaptıkları çalışmada 6 veya 12 mg / L vankomisin konsantrasyonuna karşı direnci saptanmamışlardır. Şanlıbaba ve Şentürk, (2018) yaptıkları çalışmada Türkiye'deki geleneksel peynirlerden izole ettikleri 213 *Enterococcus* suşundan 88'inin *E. faecium* ve 125'inin *E. faecalis* olduğunu bildirmişlerdir. İzolatlar rifampisin antibiyotiğine %78,4, ampisiline %48,8, eritromisine %18,8, tetrasikline %11,7, penisiline %5,6, kloromfenikole %4,2, gentamisine %3,8 dirençli bulunurken, tüm suşların vankomisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Özmen Toğay ve ark (2010), fermente gıdalardan izole edilen 16 *E. faecium* ve 68 *E. faecalis* suşlarının eritromisin antibiyotiğine %14, tetrasikline %32, gentamisine %6, kloromfenikole %3 direnç gösterdiğini ve antibiyotik direncinin *E. faecalis* izolatlarında, *E. faecium* izolatlarına göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmadaki antibiyotik sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, tüm suşların vankomisin, penisilin, ampisilin ve tetrasiklin (RI-5 suşu hariç) gibi tıbbi olarak yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, gentamisin'e karşı ise dirençli oldukları belirlenmiştir. Bazı araştırmalar, gastrointestinal sistem enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotiklere karşı, probiyotik bakterilerinin antibiyotiklere dirençli olmalarının yararlı olabileceğini ve doğal bağırsak mikrobiotasını etkili bir şekilde koruyabileceklerini ifade etmektedirler (Strompfova ve ark., 2004; Bhardway ve ark., 2010). Buna rağmen, probiyotik olarak kullanılması önerilecek bakteri suşlarının, sağlık sektöründe yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık göstermesi önemli görülmektedir (Alkalbani ve ark., 2019). Potansiyel probiyotik adaylar olan bakterilerimizde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere duyarlı bulunması önemli bir avantaj olarak görülmüştür. Probiyotiklerin belirli enfeksiyonların riskini azaltabileceğini ve böylece antibiyotik ihtiyacını azaltacağı, ayrıca antibiyotik direncinin yayılmasında katkıda bulunmadığı hatta azaltabileceği bildirilmektedir (Ouwehand ve ark., 2016). Bu çelişkili durumun ortadan kaldırılabilmesi için daha çok çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Enterokokların bazı suşları üç veya daha fazla antimikrobiyal ajan grubuna dirençli olduklarından çoklu ilaca dirençli (MDR) olarak ifade edilmektedirler. Vankomisine veya teikoplanine karşı direnç, bu ajanların MDR enterokoklara ve diğer Gram pozitif bakterilere karşı önemli terapötik kullanımı nedeniyle özellikle endişe kaynağıdır (Klare, 2003;

Hollenbeck, 2012). Ampisilin, vankomisin ve gentamisin, MDR enterokok enfeksiyonlarının tedavisi için en uygun antimikrobiyallerdir, ancak yaygın olarak kullanılan vankomisin kullanımı ciddi bir risk grubu oluşturan vankomisine dirençli enterokokların (VRE) sayısında artış sağlamıştır (Tenover ve McDonald, 2005; Golob ve ark., 2019). VRE de dahil olmak üzere antimikrobiyallere dirençli enterokoklar, antimikrobiyal direnç genlerinin türler arası transferinde önemli rol oynamaktadır (Giraffa, 2002; Golob ve ark., 2019). Enterokoklar, sadece *vanA* ve *vanB* genlerini dikey ve yatay olarak transfer etme ve yüksek direnç seviyeleri sağlama kapasitesine sahiptirler (Centinkaya ve ark. 2000; Araújo ve ark., 2013).

Fırsatçı patojen olarak enterokokların patojenitesinin oluşmasındaki en önemli etmen çoklu antibiyotik direncinin bulunmasıdır. Araştırmacılar enterokokların hayvanlardan ve sebzelerden insanlara hem doğrudan temas yoluyla hem de tüketim yoluyla yayılabileceğini, insanlarda antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına yol açabileceğini ayrıca direnç genlerini kendilerine veya başka türlere aktarabileceklerini bildirmişlerdir (Sapkota ve ark., 2011; Calónico ve ark., 2018). Tez kapsamında yapılan çalışmada *E. faecium* RI-70, RI-71, RI-75 ve referans suş *E. faecium* DSM 20477 olmak üzere 4 suş, gentamisin, rifampisin, eritromisin, polimiksin B, ofloksasin antibiyotiklerine çoklu antibiyotik direnci göstermiştir. Beshuri ve ark, (2017) domuz çiftliğinden izole ettikleri *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının %50'sinden fazlasının çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada geleneksel peynirlerden izole edilen *E. faecalis* izolatlarında %88 oranında çoklu antibiyotik direnci görülürken, *E. faecium* izolatlarının %100'ünün çoklu antibiyotik direnç gösterdiğini belirtmişlerdir (Şanlıbaba ve Şentürk, 2018). Yapılan bir çalışmada fermente gıda kaynaklı 87 *Enterococcus* cinsinden 8 *E. faecium* ve 10 *E. faecalis* izolatlarının çoklu antibiyotik direnci gösterdiği tespit edilmiştir (Özmen Toğay ve ark., 2010). Bouymajane ve ark (2018), hayvan kaynaklı gıdalarda *Enterococcus*'un varlığının, kontaminasyon belirtisinin veya zayıf hijyen koşullarının bir göstergesi olabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca *Enterococcus*'un genel olarak gıdada ve özellikle çiğ sütte tüketilmesi halk sağlığı risklerini arttırdığını ve bu izole edilmiş suşlar çok ilaca dirençli olduğunda büyük bir halk sağlığı problemi oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Vankomisin direnç genleri PZR ile belirlenmiştir. Vankomisin antibiyotiğine %100 duyarlılık gösteren suşlardan sadece *E. faecium* RI-5 suşunda *vanA* geni tespit edilmiştir. *Van B* geni ise RI-5, RI-30, RI-41, RI-46, RI-48, RI-53, RI-55, RI-61, RI-64, RI-68, RI-70,

RI-71, RI-74 suşlarında tespit edilmiştir. Cerrahi yara örneklerinden ve kan kültüründen izole edilen 26 *E. faecalis* izolatında, %53,8'inin vankomisin antibiyotiğine dirençli olduğunu, dirençli izolatların %71,4'ünde *vanA* genini bulduğunu ve vankomisin direncini *vanA* geni ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Esmail ve ark., 2019). Klinik örneklerden izole edilen enterokoklarda *vanA* ve *vanB* genlerinin oranının yüksek olduğu dikkat çekicidir. Yapılan bir çalışmada, gıda kaynaklı *Enterococcus* spp. (51) ile insan kaynaklı *E. faecium* (50) izolatlarında, 1 suş hariç gıda kaynaklı izolatların tümü vankomisine dirençli olmayıp, hiçbir izolatın *vanA* ve *vanB* geni taşımadığını bildirilmiştir. Klinik izolatların ise %84'ünün *vanA*, yüzde %2'sinin *vanB* genlerini taşıdığı ve tüm izolatların vankomisine dirençli olduğu bulunmuştur (Terkuran ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada çeşitli fermente gıdalardan izole edilen 87 *Enterococcus* cinsinden 3 *E. faecium* ve 8 *E. faecalis* izolatlarının vankomisine orta düzeyde direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. İzolatların hiçbirisi *vanB* geni içermemesine rağmen, yalnızca sosis kaynaklı *E. faecalis* S6-4 ve peynir kaynaklı *E. faecalis* P3-1 suşlarının *vanA* geni içerdiğini ve *E. faecalis* S-64 izolatında vankomisin direnci gözlenmezken, *E. faecalis* izolatında orta düzey vankomisin direnci gözlendiğini bildirmişlerdir (Özmen Toğay ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada ise insan sütünden izole edilen 7 *E. faecium* suşlarının hiçbirisinde *vanA* ve *vanB* genleri tespit edilmemiştir (Reviriego ve ark., 2005). Franya ve ark, (2019) yerel hastaneye başvuran hastalardan izole edilen 71 *E. faecium* izolatlarından 33'ünün *vanA* ve 38'inin *vanB* pozitif olduğunu belirlenmişlerdir. 384 dışkı örneği, 24 içme suyu ve 24 toprak örneğinden izole edilen 176 *Enterococcus* sp. izolatlarının %62'si *vanA*, %17'si *vanB* ve %21'i *vanC* genlerine sahip olduğu rapor edilmiştir (Foka ve Ateba, 2019). Bizim çalışmamızda ise antibiyogram testleri sonucunda *E. faecium* suşlarının hepsinin vankomisine yüksek duyarlılık göstermesi, vankomisin direnç geni içeren suşlarda vankomisin genlerinin sessiz gen olarak bulunduğunu göstermektedir.

Kromozomal DNA üzerinde bulunan *gelE* geni jelatinaz üretiminden sorumludur. Çalışmamızda kullanılan *E. faecium* suşlarının jelatinaz aktivitesi fenotipik olarak kanlı agar üzerinde, *gelE* geni varlığı ise PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Enterokokların %40' ında *gelE* geni tespit edilmiştir. Fenotipik jelatinaz aktivitesi testine göre, PZR çalışmaları sonucu *gelE* geni içerdiği tespit edilen *E. faecium* RI-5, RI-46, RI-68, RI-70, RI-71, RI-74, RI-75, RI-94 suşlarında jelatinaz aktivitesi gözlenmemiştir. Aslında, bu sonuç 'sessiz *gelE*' genlerinin varlığını göstermektedir. Jelatinazı kodlayan *gelE* geninin varlığının, jelatinaz üretimi için zorunlu olmadığı bildirilmektedir (Franz ve ark., 2001; Mannu ve ark., 2003).

Franz ve ark. (2001), peynirden izole edilen enterokok suşlarında jelatinaz aktivitesinin bulunmasını peynirin proteince zengin bir kaynak olmasından ileri gelebileceğini belirtmişlerdir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalara benzer olarak Reviriego ve ark (2005) yaptıkları çalışmada insan sütünden izole edilen 7 *E. faecium* suşlarının fenotipik analizleri sonucunda hiçbir suшта jelatinaz aktivitesi görülmediğini bildirmişlerdir. Eaton ve Gasson (2001) tarafından yapılan çalışmalarda *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında jelatinaz geni pozitif bulunmasına rağmen jelatinaz negatif fenotip görülebildiği saptanmıştır. Belgacem ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada ise *E. faecium* türüne ait 24 suştan 5 suшта *gelE* geni tespit etmişlerdir. Aynı zamanda jelatinaz aktivitesi jelatin içeren agar ortamında fenotipik olarak incelenmiş ve *gelE* geni içeren 5 izolatın jelatinaz aktivitesi göstermediğini bildirmişlerdir. Kanemitsu ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada insan kaynaklı 93 *E. faecalis* suşunun %45'inde jelatinaz aktivitesi görülürken, 46 *E. faecium* suşlarında jelatinaz aktivitesine rastlamadıklarını rapor etmişlerdir. Beshuri ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 54 *E. faecium* suşlarından 40 izolatta *gelE* geni tespit etmişlerdir.

Sitolizin, feromon-duyarlı plazmidler ya da patojenite adaları içindeki kromozomlar üzerinde kodlanabilir (Shankar ve ark., 2004). Sitolizin/ hemolizin enfeksiyon modellerinde virülansliğe katkı sağlayan ekstraselüler ürünün üretimine yol açar (Clewel, 2007). Yaptığımız PZR çalışmalar neticesinde Enterokok suşlarında *cylA* ve *cylB* gen bölgesi saptanmamıştır. Aynı zamanda kanlı agar üzerinde test edilen izolatlarda α - ve γ - hemolitik aktivite saptanırken, β - hemolitik aktivite saptanmamıştır. β - hemolitik aktivite probiyotik suşlarda istenmeyen bir durumdur. Yousif ve ark, (2005) yaptığı çalışmada Hussuwa'dan izole ettikleri 22 *E. faecium* suşlarının sitolizin geni içermediğini bildirmişlerdir. Beshuri ve ark. (2017) domuz çiftliğinden izole ettikleri *E. faecium* suşlarından yalnızca 1 izolatın *cyl* gen bölgesi içerdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada gıda kaynaklı 24 *E. faecium* suşlarında *cylA* geni tespit edilmezken, 3 suшта *cylB* geni içerdiği bildirilmiştir (Belgacem ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada insan sütünden izole edilen 7 *E. faecium* suşlarında β -hemolitik aktivite görülmediği rapor edilmiştir (Reviriego ve ark., 2005). Şanlıbaba ve Şentürk, (2018), peynirden izole edilen 213 enterokok izolatından 24 izolatta (%11,3) β -hemolitik, 21 izolat (%9,9) γ -hemolitik aktivite gösterirken, 168 suş (% 78,8) α -hemolitik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Enterokokal yüzey proteini (*esp*) hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir. *esp* proteininin ekspresyonundan sorumlu olan gen, cins içinde oldukça korunmuş bir kromozom bölgesinde bulunur ve vankomisine duyarlı veya dirençli *E. faecium* suşlarında yaygındır (Shankar ve ark., 2002). *esp* geni bulunan bakteriler, *esp* geni bakımından negatif olan kontrolleri ile kıyaslandıklarında belirgin olarak daha yüksek oranda ve daha kalın biyofilm yapıları oluşturmuşlardır (Tendolkar ve ark., 2006). Yaptığımız PZR çalışmaları sonucunda *esp* geni *E. faecium* RI-5, RI-68, RI-70, RI-74 suşlarında tespit edilmiş ve bulunma sıklığı yüzde % 20 olarak saptanmıştır. Ancak bu suşlarda biyofilm oluşturma yeteneği tespit edilmemiştir. Gıda ve insan kaynaklı 43 *E. faecium* ve 38 *E. faecalis* izolatlarından, *E. faecium* suşlarının sadece % 4,7'si, *E. faecalis* suşlarının % 42,1'i *esp* geninin varlığını göstermiştir; *esp* virülans faktörü, insan kaynaklı *E. faecalis* izolatları arasında daha sık görülmüştür (Corialota ve ark., 2008). Franz ve ark (2001), yaptığı çalışmada 48 *E. faecium* suşundan sadece 1'inin ve 47 *E. faecalis* suşundan ise 17'sinin *esp* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Özmen Toğay ve arkadaşları (2010) yaptığı çalışmada çeşitli gıdalardan izole edilen *E. faecium* (16) suşlarında enterokok yüzey proteini kodlayan *esp_{fm}* geninin bulunma yüzdesini %60 olarak belirlemişlerdir. Yapılan bir çalışmada 54 *E. faecium* suşlarından 32 izolatın *esp* gen bölgesi içerdiği tespit edilmiştir (Beshuri ve ark., 2017). Yapılan diğer bir çalışmada gıda kaynaklı 24 *E. faecium* suşlarından hiçbirisinde *esp* geni tespit edilmemiştir (Belgacem ve ark., 2010). Enterokok suşlarında *esp* geninin varlığının farklılık gösterdiği dikkat çekicidir.

agg geni tarafından kodlanan agregasyon maddesi, bakteriyel konjugasyona katılan ve plazmid transferini kolaylaştıran ve ayrıca bir ökaryotik yüzey dizisine yapışmayı içeren, feromon ile indüklenebilir bir yüzey glikoproteinidir (Koch ve ark., 2004; Popović ve ark., 2018). *asa1*, enterokokların böbrek tübüler hücrelerine, kalp endokardiyal hücrelerine, bağırsak epitel hücrelerine bakteri yapışmasını arttırdığı ve insan makrofajlarına yapışmayı ve bu hücrelerde sağkalımı arttırdığı ifade edilmiştir (Vankerckhoven ve ark., 2004). Ancak agregasyon maddesinin bir fare ÜSE modelinde virülansa katkıda bulunmadığı gösterilmiştir. Bir virülans faktörü olarak agregasyon maddesinin (*agg*, *asa1*), adezyon ve agregasyona neden olması yanısıra ayrıca konak savunmasına karşı koruyucu faktör olarak da görev yaptığı anlaşılmaktadır (Baylan, 2019). Ayrıca, Cebrián ve ark. (2012) ve Popovic ve ark. (2018) *agg* maddesi ve *esp* yüzey proteini gibi bazı virülans faktörlerinin probiyotik bakteriler için yararlı bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür. Aslında bu, bakterinin gastrointestinal sistemi kolonize etmesine ve içinde çoğalarak probiyotik özelliklerini ortaya çıkarmasına yardımcı olabileceklerini bildirmişlerdir (Zommiti ve ark., 2018). Eaton ve

Gasson (2001) *agg* geni içeren suşların mutlaka seks feromon determinantlarını da içerdiğini bildirmiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında PZR yöntemiyle araştırılan *agg* geni sadece *E. faecium* RI-74 suşunda tespit edilirken, *asa1* geni *E. faecium* RI-46, RI-68, RI-74, RT-94 suşlarında tespit edilmiştir. *agg* ve *asa1* genlerinin ikisine sahip olan tek suş ise *E. faecium* RI-74 olarak tespit edilmiştir. Corialota ve ark (2008) gıda ve insan kaynaklı 43 *E. faecium* (25 gıda kaynaklı, 18 insan kaynaklı) ve 38 *E. faecalis* (17 gıda kaynaklı, 21 insan kaynaklı) suşlarıyla yaptıkları çalışmada virülans faktörlerin bulunma oranı *E. faecalis* suşlarında daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Virülans faktörler arasında ise, *agg* virülans determinanti, *E. faecalis* (% 65,8) suşlarının gıda kaynaklı suşlarda (% 70,6), insan kaynaklı suşlara göre bulunma oranı (% 61,9) daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Domuz çiftliğinden izole edilen 54 *E. faecium* suşlarından 30 suşun *asa1* gen bölgesi içerdiği tespit edilmiştir (Beshuri ve ark., 2017). Yapılan bir başka çalışmada çeşitli gıdalardan izole edilen 16 *E. faecium* suşlarının %88'inin *agg* geni içerdiği belirlenmiştir (Özmen Toğay ve ark., 2010).

Endokardis antijeni olan EfaA, *efaA* geni tarafından kodlanmaktadır. *efaA*, mangan transport sistemi için önemli bir protein reseptörüdür. Bakterilerin hayatta kalabilmeleri ve çoğalabilmeleri için mangan gereklidir ve mangandan fakir ortamda *efaA* antijeninin fazla miktarda sentezlendiği bildirilmektedir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004). Tez kapsamında araştırılan *efaAfm* geni *E. faecium* RT-94 hariç tüm bakterilerde saptanmıştır. Özmen Toğay ve ark (2010) gıda kaynaklı 16 *E. faecium* suşlarında enterokoklarda hücre duvarı adhezi kodlayan *efaAfm* gen bölgesini %67'sinde tespit etmişlerdir. Belgacem ve ark. (2010) gıda kaynaklı 24 *E. faecium* suşundan 5 izolatın *efaAfm* geni içerdiğini tespit etmişlerdir.

Seks feromonları, enterokok suşları arasında plazmid DNA'sının konjugatif transferini kolaylaştıran küçük hidrofobik peptitlerdir (Chajęcka-Wierzchowska ve ark., 2017). Tez kapsamında araştırılan seks feromon determinantlarından *cob* gen bölgesi 3 suş hariç (*E. faecium* RI-68, RI-70, RT-101) hariç izolatların % 85' inde, *ccf* gen bölgesi *E. faecium* RI-71, RI-74, RI-78, RI-79, RI-80, RT-81, RT-82, RT-94, RT-101 suşlarında (%45) tespit edilmiştir. Belgacem ve ark, (2010) yaptıkları çalışmada gıda kaynaklı 24 *E. faecium* suşlarının *cob* geni içermediğini, 12 suşun ise *ccf* gen bölgesini içerdiğini tespit etmiştir. Özmen Toğay ve ark, (2010) çeşitli gıdalardan izole edilen 16 *E. faecium* suşlarında 1 suş hariç hepsinin *cob* ve *ccf* geni içerdiğini bildirmişlerdir.

Hyaluronidaz, gen *hyl* tarafından kodlanan bir hidrolitik enzimdir (Kayaoğlu ve Orstavik, 2004). Bağ dokusunun hücre dışı matrisinin ana kısmıdır ve tahribatı, doku içinde mikroorganizmaların yayılmasını kolaylaştıran dokunun parçalanmasına neden olmaktadır (Hynes ve Walton, 2000). Tez kapsamında araştırılan *hyl* gen bölgesi *E. faecium* RI-61 ve RI- 64 izolatlarında tespit edilmiştir. Beshuri ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 54 *E. faecium* suşlarından hiçbirisinin *hyl* geni içermediğini bildirmişlerdir. Arshadi ve ark (2017) klinik ve çevresel kaynaklardan izole edilen vankomisin dirençli *E. faecium* izolatlarının %34'ünün *hyl* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Adifon ve Tuncer (2019), peynirden izole edilen 54 *Enterococcus* sp. suşundan *E. gallinarum* ve *E. faecium* suşlarının *hyl* geni içerdiğini, *E. faecalis* suşlarının ise *hyl* geni içermediğini bildirmişlerdir.

Biyofilm, 'hücrelerin sık sık birbirine yapışmış ve / veya bir yüzeye bağlı hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) matriksine gömüldüğü' mikroorganizma kümeleri olarak tanımlanır. Biyofilmdeki mikroorganizmalar birbirine sıkıca bağlanır ve stabil bir yapı oluşturur. Biyofilmdeki mikroorganizmaların yüksek konsantrasyonundan dolayı, karşılıklı destek, özümseme ve metabolize etme yeteneği daha hızlı gerçekleşecektir. Biyofilm mikroorganizmaları zararlı dış çevresel faktörlerden ve sert yaşam koşullarından korur; bu da mikroorganizmaları birkaç saat hatta günlerce koruyabilir. Bu biyofilmin koruması altında, bakteriler şaşırtıcı derecede yüksek bir antibiyotik dozuna dayanabilirler (Post ve ark., 2004; Dıanı ve ark., 2006). Bu tez çalışmasında mikroplate yöntemi ile araştırılan biyofilm oluşumu *E. faecium* suşlarında tespit edilmemiştir. Aynı zamanda biyofilm oluşumuna katkı sağlayan *esp* ve *gelE* gen bölgelerini içeren suşlarda biyofilm oluşumuna rastlanılmaması bu genlerin sessiz gen olduğunu desteklemektedir. Singhal ve ark, (2019) Hindistan'ın farklı bölgelerinden 15 rizosferik toprak örneğinden izole edilen ve probiyotik özellikleri araştırılan 5 *E. faecium* izolatlarının orta düzeyde biyofilm aktivitesi gösterdiğini aynı zamanda virülans gen (*esp*, *cob*, *ccf*, *efaAfm*, *cyl*, *agg*, *gelE*) içermediğini bildirmişlerdir. Biyofilmde direnç oluşmasının sebebi plazmid, bakteriler arası konjugasyon, EPS varlığı ve çeşitli bakterilerin katılımı ile oluşan bir popülasyonda bazı mikroorganizmaların kalkan görevini yerine getirmesi olarak rapor edilmiştir (Ünal, 2005). Elde ettiğimiz sonuçlar ve literatür bilgilerine göre, agregasyon maddesi (*agg*), jelatinaz (*gelE*) ve enterokokkal yüzey proteini (*esp*) genlerinin biyofilm oluşumu için yeterli olmadığı ancak bu virülans faktörlerin biyofilm üretme yeteneğine yardımcı olabildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda virülans genlerin transferinde rol oynayan plazmid varlığı araştırılmış ve 20 *E. faecium* suşlarının hiçbirisinde plazmid varlığı tespit edilmemiştir. Virülans genleri kodlayan plazmidleri içeren suşların gıda sektöründe starter kültür olarak kullanılması büyük ölçüde risk taşımakta olup bu plazmidlerin analizleri özellikle gıda kaynaklı enterokoklar için önem taşımaktadır (Coleri ve ark 2004, Abriouel ve ark., 2006, Rosvoll ve ark., 2010). Toğay ve ark (2010) yaptıkları çalışmada gıda kaynaklı, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında 1 ile 4 plazmide sahip olduklarını bildirmişlerdir ve *vanA* geni içeren iki izolatında plazmid içerdiğini ve bu plazmidlerin benzer plazmid olduklarını ve iki suş arasında *vanA* direnç geninin plazmid aracılığıyla taşınmış olabileceğini bildirmişlerdir. Özmen Toğay ve ark, (2010) gıda kaynaklı *Enterococcus* izolatlarından sosis kaynaklı *E. faecalis* S6-4' ün 3 plazmid ve peynir kaynaklı *E. faecalis* P3-1'in 2 plazmid içerdiğini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda potansiyel probiyotik adayları olan enterokoklarda plazmid DNA'nın olmaması bir avantaj olarak görülmüştür.

Klinik izolatlarda agregasyon faktörü (*asa1*), enterokok yüzey proteini (*esp*), jelatinaz (*gelE*) ve hiyaluronidaz (*hyl*) virülans genleri gıda kaynaklı izolatlara göre daha yüksek bulunmuştur (Terkuran ve ark., 2014). Genel olarak çalışmada kullanılan *E. faecium* suşlarının virülans faktörleri fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılmıştır ve yapılan PZR çalışmaları sonucu enterokok suşlarının en az 2 en fazla 6 olmak üzere farklı sayıda virülans gen içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). *cylA* ve *cylB* gen bölgelerini ise hiçbir enterokok suşu içermemiştir. Enterokok suşlarında adhezin benzeri *E. faecium* A antijenini kodlayan *efaAfm*, seks feromonunu kodlayan *cob* ve vankomisin direnç geni olan *van B* genlerinin en sık rastlanılan virülans genler olduğu tespit edilmiştir. Enterokok suşlarında *efaAfm* geninin bulunma sıklığı % 95, *cob* geninin bulunma sıklığı % 85 ve *vanB* geninin bulunma sıklığı % 60 olarak hesaplanmıştır. Toplamda 20 enterokok suşu arasından *van A* genini içeren tek suş *E. faecium* RI-5, *agg* gen bölgesini içeren tek suş *E. faecium* RI-74 olmuştur.

Sonuç olarak daha önce potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş *E. faecium* suşlarının biyogüvenilirliklerinin belirlenmesi amacıyla yaptığımız çalışmalarda penisilin, tetrasiklin, ampisilin, kloromfenikol ve özellikle vankomisin antibiyotiklerine duyarlılık göstermesi, ayrıca suşların sitolizin, jelatinaz ve biyofilm aktivitesi göstermemesi ve plazmid içermemesi suşların probiyotik olarak kullanılma potansiyellerinin olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda virülans direnç genlerinin plazmid yoluyla

aktarılabileceği göz önüne alındığında suşlarda plazmide rastlanılmaması probiyotik suşlarda bir avantajdır. Ancak bu suşlarda bulunan virölans genlerin önemli virölans determinantları olmamasına karşın bu suşların tam olarak biyogüvenilirliğinin sağlanabilmesi için *in vivo* çalışmaların da yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Probiyotikler, yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık yararı sağlayan canlı mikroorganizmalar olup, insan ve hayvan enfeksiyonlarının kontrolünde ve hayvan üretiminin iyileştirilmesinde antibiyotiklere uygun alternatifler olarak kabul edilmektedirler. Dikkat çekici fonksiyonel özelliklere sahip Enterokoklar, farklı çalışmalar ile olası probiyotik adaylar olarak değerlendirilmişlerdir. Nozokomiyal enfeksiyonlarada sebep olabilen enterokokların bilinen virülans faktörlerinin olmaması potansiyel probiyotik aday olarak değerlendirilebilmesi için önemlidir.

Bu tez kapsamındaki çalışmaların sonuçlarından elde edilen verilerden aşağıdaki çıkarımlar elde edilmiştir;

1. Potansiyel probiyotik aday olan *20 E. faecium* suşunun başta vankomisin olmak üzere klinikte yaygın kullanılan penisilin, ampisilin, tetrasiklin ve kloromfenikol antibiyotiklerine duyarlılık gösterdikleri belirlenmiştir.
2. 20 suşun en az 3 en fazla 5 farklı antibiyotiğe dirençli olmasından dolayı çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları tespit edilmiştir.
3. Hiçbir suşta jelatin hidrolizi ve hemolizin (β - hemoliz) aktivitesi ve biyofilm oluşturma yeteneği görülmemiştir.
4. Vankomisin direnç genleri ve virülans genleri, bakterilerin güvenilirliklerinin belirlenmesi amacıyla çalışılmıştır. Bakterilerin en az iki, en fazla yedi farklı gen bölgelerine sahip oldukları tespit edilmiştir.
5. Son olarak, bakterilerin hiç birinde plazmid DNA'ya rastlanılmamıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlarda ve önerilerde bulunulmuştur.

1. Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlı olmaları, antibiyotiklerle ilişkili genlere sahip olmayacağı anlamına gelmediği, genlerin sessiz gen olabilecekleri bu nedenle de potansiyel probiyotik adaylarda antibiyotik duyarlılık/dirençlilik testinin yanında antibiyotik dirençliliğinden sorumlu gen bölgelerininde mutlaka çalışılması gerektiği önerilmektedir.

2. Patojenitenin en önemli göstergelerinden olan hemolizin, jelatinaz ve biyofilm aktivitelerinin 20 *Enterococcus* sp. suşunda görülmemesi önemli bir avantaj olarak değerlendirilmiştir.
3. *E. faecium* suşlarının hepsi vankomisin antibiyotiğine karşı duyarlı tespit edilirken, bazı suşlarda *vanA* (RI-5) ve *vanB* (RI-5, RI-30, RI-41, RI-46, RI-53, RI-55, RI-61, RI-64, RI-68, RI-70, RI-71, RI-74) genlerinin tespit edilmesi, vankomisin direncinden sorumlu genin ‘sessiz gen’ olduğunu belirlememiz açısından oldukça önemli görülmüştür. Çünkü uygun şartlarda aktif hale gelebilecek olan bu gen, bakterilerin patojenitesini arttırabileceği gibi, vankomisin direncinin yayılmasında da kaynak olabileceği öngörülmüştür.
4. Virülans genlerden en önemlilerinden biri olan *cylA* ve *cylB* (sitolizin) gen bölgelerine bakterilerin hiçbirinin sahip olmaması probiyotik aday olarak önerilebileceklerini göstermiştir.
5. Biyofilm oluşumunda rol oynayan ve bazı antibiyotik direnç oluşumuna katkısı olan enterokokkal yüzey proteini (*esp*) gen bölgesi tespit edilen RI-5, RI-68, RI-70 ve RI-75 suşlarında görülmesi, bununla birlikte bu bakterilerin hiçbirisinde biyofilm oluşumu görülmemesi *esp* geninin ‘sessiz gen’ olduğunu belirlememiz açısından önemlidir.
6. Özellikle gıdalarda kullanılacak probiyotik enterokoklarda, agregasyon faktörünün (*asa1*) bakterinin dokuya yapışmasını sağlamasından dolayı istenilen bir özellik olduğu, bu nedenle *asa1* genine sahip olan RI-46, RI-64, RI-74 ve RT-94 suşlarının probiyotik potansiyellerinde olmasından dolayı önemli suşlar olduğu öngörülmüştür.
7. Önemli virülans belirleyicilerinden olan enterokokkal yüzey antijeni (*efaAfm*) gen bölgelerinin ise çalışılan tüm bakterilerde tespit edilmesi, bakterilerin potansiyel probiyotik aday olarak kullanılabilmeleri de bir risk olarak öngörülmüştür.
8. Seks feromonları, virülans determinantları ve antibiyotik direncin feromon yanıt veren konjugatif plazmidler aracılığı ile diğer enterokok suşlarına yayılmasını teşvik etmesinden dolayı RI-68 ve RI-70 suşlarının *cob* ve *ccf* geni bulundurmaması önemli bir avantaj olarak değerlendirilmiştir.
9. Doku hasarına neden olan virülans faktörlerden *hyl* geninin RI-61 ve RI-64 suşlarında bulunması bu bakterilerin potansiyel probiyotik adaylar olarak önerilebilmesi için bir risk kaynağı olarak öngörülmüştür.
10. Antibiyotik ve virülans direnç genlerinin aktarılmasında plazmid DNA ‘lar çok etkili olduğundan, çalışmamızda kullanılan bakterilerin hiçbirinde plazmid DNA’nın olmaması bir avantaj olarak görülmüştür.

Sonuç olarak, hemolizin, jelatinaz ve biyofilm aktivitesi olmayan, çoğu antibiyotiğe karşı yüksek duyarlılık gösteren, çoğunlukla klinik kaynaklardan izole edilen enterokoklarda bulunan ve önemli virölans belirleyicilerinde olan *esp*, *gelE* ve *hyl* genlerini içermeyen RI-78, RI-79, RI-80, RI-81, RI-82 ve RT-101 suşlarının potansiyel probiyotik adaylar olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Her ne kadar enterokokların birçok probiyotik özelliğe sahip olsada, insanlarda enfeksiyona neden olmalarından dolayı, bu bakterilerin güvenliliği sağlanmadıkça, probiyotik olarak kullanılmaması gerektiği düşüncesindeyiz. Her bir potansiyel probiyotik enterokok suşu için güvenlik için bilinen virölans belirleyicileri ve antibiyotik direnç genleri ile ilgili net bilgiler elde edilmesi gerekmektedir. Enterokokların endüstriyel alanda probiyotik olarak ve gıda üretiminde starter kültür olarak kullanımlarının *in vivo* çalışmalarla da sorgulanması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abhisingha, M., Dumnil, J., and Pitaksutheepong, C. (2018). Selection of potential probiotic *Lactobacillus* with inhibitory activity against *Salmonella* and fecal coliform bacteria. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(2), 218-227.
- Abrantes, M. C., Kok, J., and Lopes, M. D. F. (2013). EfaR is a major regulator of *Enterococcus faecalis* manganese transporters and influences processes involved in host colonization and infection. *Infection and immunity*, 81(3), 935-944.
- Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., and Galvez, A. (2006). Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Letters in Applied Microbiology*, 42(4), 331-337.
- Adifon, D. E., ve Tuncer, Y. (2019). Peynirden İzole Edilen Yüksek Seviyede Aminoglikozid Dirençli Enterokoklarda Virülens Faktörlerin Fenotipik Ve Genotipik Yöntemler İle Araştırılması. *GIDA/The Journal of Food*, 44(4), 719-732.
- Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyeve, A., and Haertlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631-641.
- Aktürk, S., Matyar, F., Dinçer, S., and Fen, Ç. Ü. E. F. (2010). Evaluation of Antibiotic Resistance of Gram Negative Bacteria Isolated from Adana-Tufanbeyli Road Line Tap Water. *Mikrobiyal Cemiyet Dergisi*, 40(1), 54-59
- Al Atya, A. K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A., and Drider, D. (2015). Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Frontiers in microbiology*, 6, 227.
- AlKalbani, N. S., Turner, M. S., and Ayyash, M. M. (2019). Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. *Microbial cell factories*, 18(1), 188.
- Anderson, A. C., Jonas, D., Huber, I., Karygianni, L., Wölber, J., Hellwig, E., and Al-Ahmad, A. (2016). *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 6, 1534.
- Araújo, T. F., and Ferreira, C. L. D. L. F. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian archives of biology and technology*, 56(3), 457-466.
- Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonné, F., and Joly, B. (2002). In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Research in microbiology*, 153(2), 75-80.
- Arias, C. A., and Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266.

- Armin, S., Fallah, F., Karimi, A., Rashidan, M., Shirdust, M., and Azimi, L. (2017). Genotyping, antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* isolated from blood culture. *Microbial pathogenesis*, 109, 300-304.
- Arshadi, M., Douraghi, M., Shokoohizadeh, L., Moosavian, S. M., and Pourmand, M. R. (2017). High prevalence of diverse vancomycin resistance *Enterococcus faecium* isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran. *Microbial pathogenesis*, 111, 212-217.
- Aziz, F., Khan, M. N., Ahmed, S., and Andrews, S. C. (2019). Draft genome sequence of *Enterococcus faecium* SP15, a potential probiotic strain isolated from spring water. *BMC research notes*, 12(1), 99.
- Barbosa, J., Gibbs, P. A., and Teixeira, P. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21(5), 651-656.
- Baylan, I. O. (2019). Enterokok Enfeksiyonlarında İmmünopatogenez ve Virülans Faktörleri. *Nobel Medicus Journal*, 15(2), 5-16.
- Bednorz, C., Guenther, S., Oelgeschläger, K., Kinnemann, B., Pieper, R., Hartmann, S., and Bethe, A. (2013). Feeding the probiotic *Enterococcus faecium* strain NCIMB 10415 to piglets specifically reduces the number of *Escherichia coli* pathotypes that adhere to the gut mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7896-7904.
- Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., and Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- Beshiru, A., Igbinosa, I. H., Omeje, F. I., Ogofure, A. G., Eyong, M. M., and Igbinosa, E. O. (2017). Multi-antibiotic resistant and putative virulence gene signatures in *Enterococcus* species isolated from pig farms environment. *Microbial pathogenesis*, 104, 90-96.
- Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur, G., Vij, S., and Malik, R. K. (2010). Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *International journal of food microbiology*, 141(3), 156-164.
- Bhardwaj, A., Malik, R. K., and Chauhan, P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal Of Microbiology*, 48(3), 317-325.
- Bilginer, H., ve Çetin, B. (2019). Probiyotikler ve Belirlenmelerinde Kullanılan in vitro Testler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(3), 312-325.
- Billström, H., Lund, B., Sullivan, Å., and Nord, C. E. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International journal of antimicrobial agents*, 32(5), 374-377.

- Bourdon, N., Lemire, A., Fines-Guyon, M., Auzou, M., Périchon, B., Courvalin, P., and Leclercq, R. (2011). Comparison of four methods, including semi-automated rep-PCR, for the typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of microbiological methods*, 84(1), 74-80.
- Bouymajane, A., Filali, F. R., Oulghazi, S., Ed-dra, A., Benhallam, F., El Allaoui, A., and Moumni, M. (2018). Occurrence, molecular and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from raw cow's milk trade by street trading in Meknes city, Morocco. *Germs*, 8(2), 77.
- Bybee, S. N., Scorza, A. V., and Lappin, M. R. (2011). Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 856-860.
- Calonico, C., Pesavento, G., Delfino, V., Forni, S., and Nostro, A. L. (2018). Prevalence of Antibiotic Resistance in Enterococci: A 14 Year Survey. *Journal of Food and Nutrition Research*, 6(10), 626-637.
- Cattoir, V., and Leclercq, R. (2012). Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(4), 731-742.
- Cavalheiro, C., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., de Menezes, C. R., and Fries, L. L. (2019). Survival of probiotic *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium* in alginate beads during stress treatments. *Nutrition and Food Science*, 49(2), 273-283.
- Cebrián, R., Baños, A., Valdivia, E., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. (2012). Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food microbiology*, 30(1), 59-67.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., and Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 686-707.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., and Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2016). Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 117-122.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., and Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 670-676.
- Chandler, J. R., and Dunny, G. M. (2004). Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. *Peptides*, 25(9), 1377-1388.
- Clewell, D. B. (1993). Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 7(1), 9-12.
- Clewell, D. B., An, F. Y., Flannagan, S. E., Antiporta, M., and Dunny, G. M. (2000). Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Molecular microbiology*, 35(1), 246-247.

- Clewell, D. B., Flannagan, S. E., and Jaworski, D. D. (1995). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916–Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in microbiology*, 3(6), 229-236.
- Clewell, D. B., Francia, M. V., Flannagan, S. E., and An, F. Y. (2002). Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid*, 48(3), 193-201.
- CLSI (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI. 100-25
- Coleri, A., Cokmus, C., Ozcan, B., Akcelik, M., and Tukel, C. (2004). Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species. *The Journal of general and applied microbiology*, 50(4), 213-219.
- Collins, J. K., Thornton, G., and Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International dairy journal*, 8(5-6), 487-490.
- Comerlato, C. B., Resende, M. C. C. D., Caierão, J., and d'Azevedo, P. A. (2013). Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(5), 590-595.
- Costerton, J. W. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in microbiology*, 9(2), 50-52.
- Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. (2005). Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 25-34.
- Dautle, M. P., Ulrich, R. L., and Hughes, T. A. (2002). Typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicone feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. *Journal of clinical microbiology*, 40(2), 414-421.
- De Man, J. C., Rogosa, D. M., and Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- De Vuyst, L., Moreno, M. F., and Revets, H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318.
- Demirgöl, F., and Tuncer, Y. (2017). Detection of antibiotic resistance and resistance genes in enterococci isolated from sucuk, a traditional Turkish dry-fermented sausage. *Korean journal for food science of animal resources*, 37(5), 670.
- Devriese, L. A., and Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. In *The genera of lactic acid bacteria*, Springer, Boston, MA. 327-367.
- Dıranı, M., Ariafar, M. N., and Akçelik, N. (2015). İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(1), 71-80.

- Distel, J. W., Hatton, J. F., and Gillespie, M. J. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics*, 28(10), 689-693.
- Donelli, G., and Guaglianone, E. (2004). Emerging role of *Enterococcus* spp in catheter-related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *The journal of vascular access*, 5(1), 3-9.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., and Bierre, H. (2005). Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. *Research in microbiology*, 156(3), 289-297.
- Dunman, P. Á., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., and Projan, S. J. (2001). Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the agr and/or sarA Loci. *Journal of bacteriology*, 183(24), 7341-7353.
- Dunny, G. M., Leonard, B. A., and Hedberg, P. J. (1995). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. *Journal of bacteriology*, 177(4), 871.
- Eaton, T. J., and Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied Environmental Microbiology*, 67(4), 1628-1635.
- EFSA. (2008). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European food safety authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal*, 765, 2-87.
- Emaneini, M., Hosseinkhani, F., Jabalameli, F., Nasiri, M. J., Dadashi, M., Pouriran, R., and Beigverdi, R. (2016). Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* in Iran: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(9), 1387-1392.
- Erginkaya, Z., Yurdakul, N. E., ve Karakaş, A. (2007). *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis*' in Starter ve Probiyotik Kültür Özellikleri. *Gıda*, 32(3), 137-142.
- Esmail, M. A. M., Abdulghany, H. M., and Khairy, R. M. (2019). Prevalence of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecalis* in Hospital-Acquired Surgical Wound Infections and Bacteremia: Concomitant Analysis of Antimicrobial Resistance Genes. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 12, 1178633719882929.
- EUCAST (The European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing), (2016). "EUCAST Expert rules Version 3.1, Intrinsic resistance and exceptional phenotypes tables," [http://www.eucast.org/expert rules and intrinsic resistance/](http://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/).

- Ferguson, D. M., Talavera, G. N., Hernández, L. A. R., Weisberg, S. B., Ambrose, R. F., and Jay, J. A. (2016). Virulence genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in Southern California and Puerto Rico. *Journal of pathogens*, 3437214
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS microbiology letters*, 138(1), 49-54.
- Foka, T., Eric, F., and Ateba, C. N. (2019). Detection of Virulence Genes in Multidrug Resistant Enterococci Isolated from Feedlots Dairy and Beef Cattle: Implications for Human Health and Food Safety. *BioMed Research International*, 1-13.
- Fracalanza, S. A. P., Scheidegger, E. M. D., Santos, P. F. D., Leite, P. C., and Teixeira, L. M. (2007). Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7), 853-859.
- Franyó, D., Kocsi, B., Bukta, E. E., Szabó, J., and Dombrádi, Z. (2019). Assessing the intestinal carriage rates of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at a tertiary care hospital in Hungary. *Folia microbiologica*, 1-8.
- Franz, C. M., Holzapfel, W. H., and Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *International journal of food microbiology*, 47(1-2), 1-24.
- Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., and Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, 151(2), 125-140.
- Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J., and Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4385-4389.
- Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 105-122.
- Gevers, D., Huys, G., and Swings, J. (2003). In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1), 125-130.
- Gilmore, M. S., Coburn, P. S., Nallapareddy, S. R., and Murray, B. E. (2002). Enterococcal virulence. In *The enterococci*, American Society of Microbiology. 301-354
- Giraffa, G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology*, 12, 291-299.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS microbiology reviews*, 26(2), 163-171.

- Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., and Zdovc, I. (2019). Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from Humans and Retail Red Meat. *BioMed research international*, 2815279
- Gürsoy, O., ve Kınık, Ö. (2006). Peynir Teknolojisinde Enterokoklar-II: Koruyucu ve Probiyotik Kültür Olarak Kullanımları. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 43(3), 91-100.
- Hajikhani, R. (2011). Türkiye ve İran’ da üretilen beyaz peynirlerden izole edilen *Enterococcus* bakterilerinin probiyotik özelliklerinin araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hällgren, A., Claesson, C., Saeedi, B., Monstein, H. J., Hanberger, H., and Nilsson, L. E. (2009). Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(5), 323-332.
- Hammad, A. M., Hassan, H. A., and Shimamoto, T. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus spp.* in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food control*, 50, 815-820.
- Hammerum, A. M., Baig, S., Kamel, Y., Roer, L., Pinholt, M., Gumpert, H., and Kjærsgaard, M. (2017). Emergence of vanA *Enterococcus faecium* in Denmark, 2005–15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2184-2190.
- Hammerum, A. M., Lester, C. H., and Heuer, O. E. (2010). Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard?. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(10), 1137-1146.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., and Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—An update. *Frontiers in microbiology*, 9:1791.
- Hancock, L. E., and Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of bacteriology*, 186(17), 5629-5639.
- Heikens, E., Bonten, M. J., and Willems, R. J. (2007). Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of bacteriology*, 189(22), 8233-8240.
- Hoang, P. H., Cung, T. N. M., Nguyen, T. M., Do, T. L., Do, L. P., and Le, T. N. C. (2018). Isolation and selection of probiotic bacteria capable of forming biofilm for fermenting soybean meal. *Journal of Vietnamese Environment*, 9(2), 99-105.
- Hollenbeck, B. L., and Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), 421-569.

- Holzapfel, W., Arini, A., Aeschbacher, M., Coppolecchia, R., and Pot, B. (2018). *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Beneficial microbes*, 9(3), 375-388.
- Howarth, G. S., and Wang, H. (2013). Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients*, 5(1), 58-81.
- Hu, C., Xing, W., Liu, X., Zhang, X., Li, K., Liu, J., and Tan, C. (2019). Effects of dietary supplementation of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance and gut microbiota in weaned piglets. *AMB Express*, 9(1), 33.
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7, 167.
- Hugas, M., Garriga, M., and Aymerich, M. T. (2003). Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 223-233.
- Huycke, M. M., Spiegel, C. A., and Gilmore, M. S. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(8), 1626-1634.
- Hynes, W. L., and Walton, S. L. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology letters*, 183(2), 201-207.
- Ike, Y., Hashimoto, H., and Clewell, D. B. (1984). Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. *Infection and Immunity*, 45(2), 528-530.
- Jahan, M., Zhanel, G. G., Sparling, R., and Holley, R. A. (2015). Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *International journal of food microbiology*, 199, 78-85.
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M. A., Chamba, J. F., Bertrand, X., and Serror, P. (2012). Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiology*, 31(2), 191-198.
- Jaouani, I., Abbassi, M. S., Ribeiro, S. C., Khemiri, M., Mansouri, R., Messadi, L., and Silva, C. C. G. (2015). Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 1089-1100.
- Javed, A., Masud, T., ul Ain, Q., Imran, M., and Maqsood, S. (2011). Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. *Annals of microbiology*, 61(4), 699-708.
- Jett, B. D., Huycke, M. M., and Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews*, 7(4), 462-478.
- Jiménez, E., Ladero, V., Chico, I., Maldonado-Barragán, A., López, M., Martín, V., and Rodríguez, J. M. (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC microbiology*, 13(1), 288.

- Johnson, A. P. (1994). The pathogenicity of enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(6), 1083-1089.
- Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Karlowsky, J. A., Sahm, D. F., and Wenzel, R. P. (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000–2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3(1), 14.
- Kahya, S., Buyukcangaz, E., and Carlı, K. T. (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32(1), 31-38.
- Kanemitsu, K., Nishino, T., Kunishima, H., Okamura, N., Takemura, H., Yamamoto, H., and Kaku, M. (2001). Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *Journal of microbiological methods*, 47(1), 11-16.
- Karaseva, A., Tsapieva, A., Pachebat, J., and Suvorov, A. (2016). Draft genome sequence of probiotic *Enterococcus faecium* strain L-3. *Genome Announc.*, 4(1), 01622-15.
- Kayaoglu, G., and Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 15(5), 308-320.
- Kayser, F. H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 255-262.
- Kim, S. Y., Lee, J. E., Lee, S., Lee, H. T., Hur, H. G., and Ko, G. (2010). Characterization of *Enterococcus* spp. from human and animal feces using 16S rRNA sequences, the esp gene, and PFGE for microbial source tracking in Korea. *Environmental science and technology*, 44(9), 3423-3428.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G., and Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 269-290.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 123-131.
- Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., and Huebner, J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22(7), 822-830.
- Kozłowicz, B. K., Dworkin, M., and Dunny, G. M. (2006). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity?. *International journal of medical microbiology*, 296(2-3), 141-147.
- Kristich, C. J., Rice, L. B., and Arias, C. A. (2014). Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. In *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet]. Massachusetts *Eye and Ear Infirmary*.

- Lan, R. X., Kim, J. K., Liu, Y. H., Yun, H. M., and Kim, I. H. (2017). Effects of dietary supplementation with a probiotic (*Enterococcus faecium*) on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbiota, and fecal score in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 95, 80.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R., and Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *Comptes rendus biologies*, 329(11), 849-857.
- Leavis, H., Top, J., Shankar, N., Borgen, K., Bonten, M., van Embden, J., and Willems, R. J. (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of bacteriology*, 186(3), 672-682.
- Leroy, F., Moreno, M. F., and De Vuyst, L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 235-240.
- Leung, J. W., Liu, Y. L., Desta, T. D., Libby, E. D., Inciardi, J. F., and Lam, K. (2000). In vitro evaluation of antibiotic prophylaxis in the prevention of biliary stent blockage. *Gastrointestinal endoscopy*, 51(3), 296-303.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Li, B., Zhan, M., Evivie, S. E., Jin, D., Zhao, L., Chowdhury, S., and Sarker, S. K. (2018). Evaluating the safety of potential probiotic *Enterococcus durans* KLDS6. 0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study. *Frontiers in microbiology*, 9, 1943.
- Li, N., Yu, H., Liu, H., Wang, Y., Zhou, J., Ma, X., and Qiao, S. (2019). Horizontal transfer of vanA between probiotic *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in fermented soybean meal and in digestive tract of growing pigs. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 36.
- Liu, W., Zhang, L., Shi, J., Yi, H., Zhang, Y., Zhang, S., and Yu, X. (2015). Assessment of the safety and applications of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* Y31 as an adjunct culture in North-eastern Chinese traditional fermentation paocai. *Food control*, 50, 637-644.
- Liu, X., Wang, Y., Wang, H., and Lu, W. (2014). Effect of a liquid culture of *Enterococcus faecalis* CGMCC1. 101 cultivated by a high density process on the performance of weaned piglets. *Livestock Science*, 170, 100-107.
- Liu, Y. (2013). *The dissemination mechanism of the multi-resistant gene cfr in Enterococcus spp. from animal origin*. Doctor's thesis, Agricultural University, Beijing, Chinese.
- Lopes, M. D. F. S., Ribeiro, T., Abrantes, M., Marques, J. J. F., Tenreiro, R., and Crespo, M. T. B. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International journal of food microbiology*, 103(2), 191-198.

- Madhavan, H. N., and Murali, S. (2011). Mechanisms of development of antibiotic resistance in bacteria among clinical specimens. *Journal of Clinical and Biomedical Sciences*, 1(2), 42-48.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., and Sechi, L. A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 291-304.
- Martins Teixeira, L., and Facklam, R. R. (2003). *Enterococcus*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC. *Manual of clinical microbiology*. (8th edition). Washington: ASM, 422-33.
- Meral, H., ve Korukluoğlu, M. (2014). Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç mekanizmaları. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.
- Moellering Jr, R. C. (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical infectious diseases*, 14: 1173-1176.
- Mohamed, J. A., and Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*, 56(12), 1581-1588.
- Mohamed, J. A., Huang, W., Nallapareddy, S. R., Teng, F., and Murray, B. E. (2004). Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity*, 72(6), 3658-3663.
- Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International journal of food microbiology*, 106(1), 1-24.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., and Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51, 263-273.
- Murray, B. E. (2000). Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*, 342(10), 710-721.
- Mutters, N. T., Mersch-Sundermann, V., Mutters, R., Brandt, C., Schneider-Brachert, W., and Frank, U. (2013). Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospital: epidemiology and clinical relevance. *Deutsches Ärzteblatt International*, 110(43), 725.
- Nallapareddy, S. R., Wenxiang, H., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2005). Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *Journal of bacteriology*, 187(16), 5709-5718.
- Nascimento, L. C. S., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., and Penna, A. L. B. (2019). Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Annals of microbiology*, 69(3), 241-252.

- Natarajan, P., and Parani, M. (2015). First complete genome sequence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain T-110 and its comparative genome analysis with pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus faecium* genomes. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(1), 43-46.
- Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J. C., Baquero, F., and Peixe, L. V. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1139-1143.
- Oancea, C., Klare, I., Witte, W., and Werner, G. (2004). Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(1), 232-235.
- Ochoa, S. A., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., Saldaña, Z., Cázares-Domínguez, V., and Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC microbiology*, 13(1), 291.
- Omar, A., Wright, J. B., Schultz, G., Burrell, R., and Nadworny, P. (2017). Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 5(1), 9.
- Omar, N. B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M., Franz, C. M., Gálvez, A. (2004). Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 118-130.
- Ouwehand, A. C., Forssten, S., Hibberd, A. A., Lyra, A., and Stahl, B. (2016). Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of medicine*, 48(4), 246-255.
- Özmen Toğay, S., Çelebi Keskin, A., Açıık, L., and Temiz, A. (2010). Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *Journal of applied microbiology*, 109(3), 1084-1092.
- Pieniz, S., de Moura, T. M., Cassenego, A. P. V., Andreazza, R., Frazzon, A. P. G., de Oliveira Camargo, F. A., and Brandelli, A. (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*, 51, 49-54.
- Pillai, S. K., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Moellering Jr, R. C., Murray, B. E., and Inouye, R. T. (2004). Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infectious Diseases*, 190(5), 967-970.
- Pillar, C. M., and Gilmore, M. S. (2004). Enterococcal virulence—pathogenicity island of *E. faecalis*. *Frontiers in Bioscience*, 9(1-3), 2335-2346.
- Pinkston, K. L., Gao, P., Diaz-Garcia, D., Sillanpää, J., Nallapareddy, S. R., Murray, B. E., and Harvey, B. R. (2011). The Fsr Quorum-Sensing System of *Enterococcus faecalis* Modulates Surface Display of the Collagen-Binding MSCRAMM Ace through Regulation of gelE. *Journal of bacteriology*, 193(17), 4317-4325.

- Podbielski, A., and 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.
- Poeta, P., Costa, D., Sáenz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J., and Torres, C. (2005). Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52(9), 396-402.
- Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., and Veljović, K. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Frontiers in microbiology*, 9, 78.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall–Stoodley, L., and Ehrlich, G. D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery*, 12(3), 185-190.
- Poyart, C., Lambert, T., Morand, P., Abassade, P., Quesne, G., Baudouy, Y., and Trieu-Cuot, P. (2002). Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae*. *Journal of clinical microbiology*, 40(7), 2689-2690.
- Protonotariou, E., Dimitroulia, E., Pournaras, S., Pitiriga, V., Sofianou, D., and Tsakris, A. (2010). Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *Journal of Hospital Infection*, 75(3), 225-227.
- Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., and Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis* fsrGenes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. *Infection and immunity*, 68(5), 2579-2586.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., and Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M. J., and Rodríguez, J. M. (2005). Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21(2), 131-137.
- Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K., and Stanton, C. (2002). Cheese delivering biocultures--probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2), 71.
- Rosvoll, T. C., Pedersen, T., Sletvold, H., Johnsen, P. J., Sollid, J. E., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A. (2010). PCR-based plasmid typing in *Enterococcus faecium* strains reveals widely distributed pRE25-, pRUM-, pIP501-and pHT β -related replicons associated with glycopeptide resistance and stabilizing toxin–antitoxin systems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 58(2), 254-268.
- Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., and de Valdez, G. F. (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International journal of food microbiology*, 88(2-3), 241-245.

- Sabbuba, N., Hughes, G., and Stickler, D. J. (2002). The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. *BJU international*, 89(1), 55-60.
- Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M., and García, A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.
- Salminen, S., Isolauri, E., and Wright, A., (2003). Safety of Probiotic Bacteria. *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*, Ed: V.R. Preedy, Taylor and Francis Group, New York, USA, 271-283.
- Sánchez, J., Basanta, A., Gómez-Sala, B., Herranz, C., F, L. M., and Hernández, P. E. (2007). Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *International journal of food microbiology*, 117(3), 295-305.
- Sanlibaba, P., Tezel, B. U., and Senturk, E. (2018). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from chicken in Turkey. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(2), 391.
- Sapkota, A. R., Hulet, R. M., Zhang, G., McDermott, P., Kinney, E. L., Schwab, K. J., and Joseph, S. W. (2011). Lower prevalence of antibiotic-resistant enterococci on US conventional poultry farms that transitioned to organic practices. *Environmental health perspectives*, 119(11), 1622-1628.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., and Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11(8), 621-647.
- Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., and Marre, R. (2000). Aggregation Substance Increases Adherence and Internalization, but Not Translocation, of *Enterococcus faecalis* through Different Intestinal Epithelial Cells In Vitro. *Infection and immunity*, 68(10), 6044-6047.
- Sava, I. G., Heikens, E., and Huebner, J. (2010). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection*, 16(6), 533-540.
- Schleifer, K. H., and Kilpper-Bälz, 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 and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 31-34.
- Schleifer, K. H., and Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology*, 10(1), 1-19.
- Semedo, T., Santos, M. A., Martins, P., Lopes, M. F. S., Marques, J. J. F., Tenreiro, R., and Crespo, M. T. B. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569-2576.

- Shankar, N., Baghdayan, A. S., and Gilmore, M. S. (2002). Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*, 417(6890), 746-750.
- Shankar, N., Coburn, P., Pillar, C., Haas, W., and Gilmore, M. (2004). Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(7-8), 609-618.
- Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G., and Gilmore, M. S. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity*, 67(1), 193-200.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., and Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195.
- Shepard, B. D., and Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4(2), 215-224.
- Singhal, N., Maurya, A. K., Mohanty, S., Kumar, M., and Viridi, J. S. (2019). Evaluation of Bile Salt Hydrolases, Cholesterol-Lowering Capabilities, and Probiotic Potential of *Enterococcus faecium* Isolated From Rhizosphere. *Frontiers in microbiology*, 10, 1567
- Soto, S. M. (2014). Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Advances in biology*, 543974.
- Strompfová, V., Lauková, A., and Ouwehand, A. C. (2004). Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Veterinary Microbiology*, 100(1-2), 107-114.
- Strzelecki, J., Sadowy, E., and Hryniewicz, W. (2011). Enterococcal surface proteins responsible for interactions with host tissues. *Postepy Mikrobiologii*, 50(1), 31-42.
- Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P. I. N. G., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fiedler, S., and Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. liquefaciens. *Infection and immunity*, 59(1), 415-420.
- Sun, P., Wang, J., and Jiang, Y. (2010). Effects of *Enterococcus faecium* (SF68) on immune function in mice. *Food chemistry*, 123(1), 63-68.
- Švec, P., and Franz, C. M. A. P. (2014). "The genus *Enterococcus*," in *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*, eds W. H. Holzapfel and B. J. B. Wood (Chichester: Wiley Blackwellpp), 175–211. doi: 10.1002/9781118655252.ch15
- Sydnor, E. R., and Perl, T. M. (2011). Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 141-173.
- Teixeira, N., Santos, S., Marujo, P., Yokohata, R., Iyer, V. S., Nakayama, J., and Lopes, M. D. F. S. (2012). The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum sensing signal. *Microbiology*, 158(2), 519.

- Temiz, A., 2014. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Altıncı baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, Türkiye.
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., and Shankar, N. (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 188(6), 2063-2072.
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., Gilmore, M. S., and Shankar, N. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity*, 72(10), 6032-6039.
- Tenover, F. C., and McDonald, L. C. (2005). Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18(4), 300-305.
- Terkuran, M., Erginkaya, Z., Ünal, E., Guran, M., Kizilyildirim, S., and Gökce, U. (2014). The relationship between virulence factors and vancomycin resistance among Enterococci collected from food and human samples in Southern Turkey. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 61, 133-40.
- Tewari, S., David, J., and Gautam, A. (2019). A review on probiotic dairy products and digestive health. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 368-372.
- Thacker, P. A. (2013). Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 4(1), 35.
- Tomita, H., and Ike, Y. (2004). Tissue-specific adherent *Enterococcus faecalis* strains that show highly efficient adhesion to human bladder carcinoma T24 cells also adhere to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity*, 72(10), 5877-5885.
- Torun, A. (2017). Selçuk Üniversitesi Tıp fakültesi hastanesi'nde 2012-2015 yılları arasında görülen vankomisin dirençli enterokokların dağılımı ve irdelenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Konya.
- Trivedi, K., Cupakova, S., and Karpiskova, R. (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56(7), 352-357.
- Upadhyaya, P. G., Ravikumar, K. L., and Umapathy, B. L. (2009). Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. *Indian journal of medical microbiology*, 27(4), 301.
- Uymaz, B. (2010). Probiyotikler ve kullanım alanları. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 95-104.
- Ünal, B. (2005). *Değişik Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Tespiti ve Biyofilm Oluşumunun Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Vael, C., and Goossens, H. (2002). Enterococci as probiotics: Chances and challenges. Presentations: Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects, *European Commission Project FAIR-CT97-3078*, 30-31.

- Van Wamel, W. J., Hendrickx, A. P., Bonten, M. J., Top, J., Posthuma, G., and Willems, R. J. (2007). Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infection and immunity*, 75(2), 924-931.
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., and 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.
- Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S., and Biavasco, F. (2011). Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Current microbiology*, 62(5), 1438-1447.
- Wang, Y. B., Du, W., Fu, A. K., Zhang, X. P., Huang, Y., Lee, K. H., and Li, Y. L. (2016). Intestinal microbiota and oral administration of *Enterococcus faecium* associated with the growth performance of new-born piglets. *Beneficial microbes*, 7(4), 529-538.
- Wang, Y., Liu, X. T., Wang, H. L., Li, D. F., Piao, X. S., and Lu, W. Q. (2014). Optimization of processing conditions for solid-state fermented soybean meal and its effects on growth performance and nutrient digestibility of weanling pigs. *Livestock Science*, 170, 91-99.
- Wardal, E., Sadowy, E., and Hryniewicz, W. A. L. E. R. I. A. (2010). Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Polish Journal of Microbiology*, 59(2), 79-87.
- Witte, W., Wirth, R., and Klare, I. (1999). Enterococci. *Chemotherapy*, 45(2), 135.
- Yang, J., Yuan, Y., Tang, M., Liu, L., Yang, K., and Liu, J. (2019). Phenotypic and genetic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microbial pathogenesis*, 128, 131-135.
- Yerlikaya, O., and Akbulut, N. (2019). In vitro characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of Dairy Technology*.
- Yin, M., Jiang, Y., Qian, C., Wu, F., Ying, Y., Wu, C., and Bao, Q. (2018). Molecular characteristics and comparative genomics analysis of a clinical *Enterococcus casseliflavus* with a resistance plasmid. *Infection and drug resistance*, 11, 2159.
- Yousif, N. M. K., Dawyndt, P., Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., and Franz, C. M. A. P. (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 216-228.
- Yu, M., Zhang, C., Yang, Y., Mu, C., Su, Y., Yu, K., and Zhu, W. (2017). Long-term effects of early antibiotic intervention on blood parameters, apparent nutrient digestibility, and fecal microbial fermentation profile in pigs with different dietary protein levels. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1), 60.

- Yuen, G. J., and Ausubel, F. M. (2014). *Enterococcus* infection biology: lessons from invertebrate host models. *Journal of microbiology*, 52(3), 200-210.
- Zegans, M. E., Becker, H. I., Budzik, J., and O'Toole, G. (2002). The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA and cell biology*, 21(5-6), 415-420.
- Zeyner, A., and Boldt, E. (2006). Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 90(1-2), 25-31.
- Zommiti, M., Cambrone, M., Maillot, O., Barreau, M., Sebei, K., Feuilloley, M., and Connil, N. (2018). Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat "Dried Ossban". *Frontiers in microbiology*, 9.

EKLER

EK-1. *E. faecium* strain LAC7.2 chromosome, complete genome (*vanA*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1329 bits(691)	0.0	693/694(99%)	0/694(0%)	Plus/Minus
Query 104	GGCAAGAAAGTAAGTTTCGTACCATTTGCAGCAGCAACTTCTTTAAATCGTTTCCGATTA	163		
Sbjct 1210061	GGCAAGAAAGTAAGTTTCGTACCATTTGCAGCAGCAACTTCTTTAAATCGTTTCCGATTA	1210002		
Query 164	TCCCATAGTTTATACACTTCTACTTCATCATGCAATGTCACGTGTGGAGCTGTATGCTTA	223		
Sbjct 1210001	TCCCATAGTTTAGACACTTCTACTTCATCATGCAATGTCACGTGTGGAGCTGTATGCTTA	1209942		
Query 224	CTGTTGACCATTGCTTTAGCGATAGCTTTACGTGTTGGCGTCATTGCTACACGTTCTTCC	283		
Sbjct 1209941	CTGTTGACCATTGCTTTAGCGATAGCTTTACGTGTTGGCGTCATTGCTACACGTTCTTCC	1209882		
Query 284	AAGTCTCCTAAGTTGGACTTGAATGGTTTTGCTGGTGCAGCTGGTTTCTTCTGCTGCA	343		
Sbjct 1209881	AAGTCTCCTAAGTTGGACTTGAATGGTTTTGCTGGTGCAGCTGGTTTCTTCTGCTGCA	1209822		
Query 344	GGAGCTGCTTCTTTGCGTGTGCGCTTCTGGCGCTTCTGATTTGCTGGTGCAGTGTCTT	403		
Sbjct 1209821	GGAGCTGCTTCTTTGCGTGTGCGCTTCTGGCGCTTCTGATTTGCTGGTGCAGTGTCTT	1209762		
Query 404	GGACCACCTGCCAAGAAGTTTTGATGTCTCTTTTGTACTCTGCCACCTTTTCCAGTT	463		
Sbjct 1209761	GGACCACCTGCCAAGAAGTTTTGATGTCTCTTTTGTACTCTGCCACCTTTTCCAGTT	1209702		
Query 464	GCAGTACTTGTGAGATATCTACATCTTTTTACGGGCAAATTGACGAACAGATGGCATA	523		
Sbjct 1209701	GCAGTACTTGTGAGATATCTACATCTTTTTACGGGCAAATTGACGAACAGATGGCATA	1209642		
Query 524	GCCAATACACGTTTATTTGGATCGGCAGCTTCAACGACACTTGCTGAACCTGATGTTTCC	583		
Sbjct 1209641	GCCAATACACGTTTATTTGGATCGGCAGCTTCAACGACACTTGCTGAACCTGATGTTTCC	1209582		
Query 584	ACTTTTTCTTTTGGTGCTTCAGCTGATGGCGCACTAGTTGACGGTGCAGTATTGTGTCCA	643		
Sbjct 1209581	ACTTTTTCTTTTGGTGCTTCAGCTGATGGCGCACTAGTTGACGGTGCAGTATTGTGTCCA	1209522		
Query 644	GGAGCATCGATTTCTACTAATACATCCCCAACATTTGCTACAGTGCCTTCTGGAACAATC	703		
Sbjct 1209521	GGAGCATCGATTTCTACTAATACATCCCCAACATTTGCTACAGTGCCTTCTGGAACAATC	1209462		
Query 704	ACGTTTTTAACTGTCCCTGTGACAGGTGACGGAATTTCTTCTACTGATTTGTCAATTTGA	763		
Sbjct 1209461	ACGTTTTTAACTGTCCCTGTGACAGGTGACGGAATTTCTTCTACTGATTTGTCAATTTGA	1209402		
Query 764	ACTTCTAGTAATGTATCATCTTCATTGATCGTAT	797		
Sbjct 1209401	ACTTCTAGTAATGTATCATCTTCATTGATCGTAT	1209368		

EK-2. *E. faecium* NRRL B-2354, complete genome (*vanB*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1536 bits(799)	0.0	803/805(99%)	0/805(0%)	Plus/Plus
Query 10	AATTTCCCTGTATCATCAATAGTTGTTTCGGACAAAACAGCTTGAttttttttCAATGAA	69		
Sbjct 1424267	AATTTCCCTGTATCATCAATAGTTGTTTCGGACAAAACAGCTTGATTTTTTTCAATGAA	1424326		
Query 70	ACCAAAGCTCCTGCTTCGCCTGTACCTGTGATTGAGCGAGAAGCTGCATTGATCAATGTG	129		
Sbjct 1424327	ACCAAAGCTCCTGCTTCGCCTGTACCTGTGATTGAGCGAGAAGCTGCATTGATCAATGTG	1424386		
Query 130	GTACTTAATTTAGCAGGCTCAGGAGGAATCACATCGACTGTCGTTTTGGCAGAGTCCAGT	189		
Sbjct 1424387	GTACTTAATTTAGCAGGCTCAGGAGGAATCACATCGACTGTCGTTTTGGCAGAGTCCAGT	1424446		
Query 190	TCTGTCACTTCTTGGCCGCCTCTTACTTTTTTAGCAGCAACTATTTGCACCTTGATCCCCC	249		
Sbjct 1424447	TCTGTCACTTCTTGGCCGCCTCTTACTTTTTTAGCAGCAACTATTTGCACCTTGATCCCCC	1424506		
Query 250	GTTGTTAGTCTTTCTTCGTTGGGTACTTGAACTCAAACAAACCGCCTTGTTGCGCTTCT	309		
Sbjct 1424507	GTTGTTAGTCTTTCTTCGTTGGGTACTTGAACTCAAACAAACCGCCTTGTTGCGCTTCT	1424566		
Query 310	CCCCACGGATTATATCCTGCCCTTCATTTTCATCTGTTTGTCTTGTGTGAGAGCAGTA	369		
Sbjct 1424567	CCCCACGGATTATATCCTGCCCTTCATTTTCATCTGTTTGTCTTGTGTGAGAGCAGTA	1424626		
Query 370	ATTTCTACAGGTGATTTCGTGCTATCTGCATAAGTAATACGTAAAGTCACCTCTACTTCG	429		
Sbjct 1424627	ATTTCTACAGGTGATTTCGTGCTATCTGCATAAGTAATACGTAAAGTCACCTCTACTTCG	1424686		
Query 430	CCTGTCCAAGCATCTCTTGGCTTTGCCTCGACACCTTCGGGAACAACGACATGCCCATAG	489		
Sbjct 1424687	CCTGTCCAAGCATCTCTTGGCTTTGCCTCGACACCTTCGGGAACAACGACATGCCCATAG	1424746		
Query 490	AttttttttATCTGCATTGCTTGGTACTCTTAAGGATTCAATCATCGGAAGCTGGTTATTG	549		
Sbjct 1424747	ATTTTTTTATCTGCATTGCTTGGTACTCTTAAGGATTCAATCATCGGAAGCTGGTTATTG	1424806		
Query 550	GCACTGATTGATTATAAATTTTTCATTCCGGCACCTGTCTGAGCAAATTCATTTGTTAAA	609		
Sbjct 1424807	GCACTGATTGATTATAAATTTTTCATTCCGGCACCTGTCTGAGCAAATTCATTTGTTAAA	1424866		
Query 610	CCTGCACTAGGGCTTGATACAAAATTACCTAAGTCGGTTCCATTGATCGATAAGTATGTC	669		
Sbjct 1424867	CCTGCACTAGGGCTTGATACAAAATTACCTAAGTCGGTTCCATTGATCGATAAGTATGTC	1424926		
Query 670	ATATCAGAAAAATAATCCGGATCTTTTCAAAGTTATCGAACGTTGCTCCTGCCTTTCGC	729		
Sbjct 1424927	ATATCAGAAAAATAATCCGGATCTTTTCAAAGTTATCGAACGTTGCTCCTGCCTTTCGC	1424986		
Query 730	CATAAAGCAATTTCTGAATGAGCGATCTTCAAAGAAGAAATCGCCATTTCTTGAAATACC	789		
Sbjct 1424987	CATAAAGCAATTTCTGAATGAGCGATCTTCAAAGAAGAAATCGCCATTTCTTGAAATACC	1425046		
Query 790	CAGCCACCTATGCCATTAGCTTCGC	814		
Sbjct 1425047	CAGCCACCTATGCCATTAGCTTCGC	1425071		

EK-3. *E. faecalis* strain MD4 gelatinase (*gelE*) gene, partial cds (*gelE*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
675 bits(351)	0.0	351/351(100%)	0/351(0%)	Plus/Plus
Query 10	GAACATGTCGGTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAATGTACCA	69		
Sbjct 534	GAACATGTCGGTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAATGTACCA	593		
Query 70	GTTGAAAAAAGCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAACACAGGGGTTTACCAT	129		
Sbjct 594	GTTGAAAAAAGCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAACACAGGGGTTTACCAT	653		
Query 130	GCAGTAGTTGATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTA	189		
Sbjct 654	GCAGTAGTTGATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTA	713		
Query 190	AATCAGAATGCTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGAT	249		
Sbjct 714	AATCAGAATGCTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGAT	773		
Query 250	CATTTCCAACGACACAGTATTGATGATCGAGGGATGCCCATCTTGTCAGTTGTTGATGAA	309		
Sbjct 774	CATTTCCAACGACACAGTATTGATGATCGAGGGATGCCCATCTTGTCAGTTGTTGATGAA	833		
Query 310	CAACATCCAGATGCTTATGACAATGCTTTTTGGGATGGAAAAGCAATGCGT	360		
Sbjct 834	CAACATCCAGATGCTTATGACAATGCTTTTTGGGATGGAAAAGCAATGCGT	884		

EK-4. *E. faecalis* strain LD33, complete genome (*esp*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1694 bits(881)	0.0	888/889(99%)	1/889(0%)	Plus/Plus
Query 10	ACCTTTAGATGAA-TCTTAGAAGAAATGAAAGCAGCGGATAAAATCGAAGAAAATGCGCC	68		
Sbjct 2336446	ACCTTTAGATGAAATCTTAGAAGAAATGAAAGCAGCGGATAAAATCGAAGAAAATGCGCC	2336505		
Query 69	ATTTGGTGAAGATTTTCATCTTTGATTCTTGGTTGTCTGGATACGAATAAAAAATTAATCCA	128		
Sbjct 2336506	ATTTGGTGAAGATTTTCATCTTTGATTCTTGGTTGTCTGGATACGAATAAAAAATTAATCCA	2336565		
Query 129	GAATACTTATGGAACAGGTTATTATTATTTGCAAGATATTGATGGTGATGGAAACCTGA	188		
Sbjct 2336566	GAATACTTATGGAACAGGTTATTATTATTTGCAAGATATTGATGGTGATGGAAACCTGA	2336625		
Query 189	CGATAAAGAAGAGAGCGGAGACACGAATCCATATATCGGGAACCTGAATTAGAAGAAGT	248		
Sbjct 2336626	CGATAAAGAAGAGAGCGGAGACACGAATCCATATATCGGGAACCTGAATTAGAAGAAGT	2336685		
Query 249	ATATGATGTTGACACAACAGTTAAGGGGAAAGTATTTCATCCACGAGTTAGCGGGAACAGA	308		
Sbjct 2336686	ATATGATGTTGACACAACAGTTAAGGGGAAAGTATTTCATCCACGAGTTAGCGGGAACAGA	2336745		
Query 309	TCACAAAGCGCAACTTGTGATAAAGAAGGTAAGTATTAGCAGAAAAAACTATCGCTCC	368		
Sbjct 2336746	TCACAAAGCGCAACTTGTGATAAAGAAGGTAAGTATTAGCAGAAAAAACTATCGCTCC	2336805		
Query 369	AAATGAAAAAGATGGGGCTCAATTTTCAGATACTGTAGAATTTGAATTTACGGGTGTAGA	428		
Sbjct 2336806	AAATGAAAAAGATGGGGCTCAATTTTCAGATACTGTAGAATTTGAATTTACGGGTGTAGA	2336865		
Query 429	TTCAAGTAACTAATCGCGAAAGATGAATTAATAATCCAAATCGTTTCTCCAGGTTTGA	488		
Sbjct 2336866	TTCAAGTAACTAATCGCGAAAGATGAATTAATAATCCAAATCGTTTCTCCAGGTTTGA	2336925		
Query 489	TAAACCAGAAGAAGGTTCAACCGTTATTAAAGGAATCACCAAAAGCGGTTGATAAACAAAC	548		
Sbjct 2336926	TAAACCAGAAGAAGGTTCAACCGTTATTAAAGGAATCACCAAAAGCGGTTGATAAACAAAC	2336985		
Query 549	CGTGGTAGTTGGATTTAAACCAGATGCTAAGAATCAATTCGGAATAATAAAAACTTACC	608		
Sbjct 2336986	CGTGGTAGTTGGATTTAAACCAGATGCTAAGAATCAATTCGGAATAATAAAAACTTACC	2337045		
Query 609	TGAAGATGCAGAGTATTCATGGAAAAAGAGCCTGATACTTCTAACGTTACTGATAGTAC	668		
Sbjct 2337046	TGAAGATGCAGAGTATTCATGGAAAAAGAGCCTGATACTTCTAACGTTACTGATAGTAC	2337105		
Query 669	GAAAGGTATTGTAAGTGTAAAGATAGGAAATCGAATTTTCGACGTGGATGTAGAGTTTGC	728		
Sbjct 2337106	GAAAGGTATTGTAAGTGTAAAGATAGGAAATCGAATTTTCGACGTGGATGTAGAGTTTGC	2337165		
Query 729	TGTAAAAGCTTCTCAAGCTATGGAAATGATGCAACATACGTACCTATAACAACAACCCC	788		
Sbjct 2337166	TGTAAAAGCTTCTCAAGCTATGGAAATGATGCAACATACGTACCTATAACAACAACCCC	2337225		
Query 789	AGAAACGACAATTCAAAGTGGTAAACCTACATTTGATAAACAGATGTTCTCTAGCTAA	848		
Sbjct 2337226	AGAAACGACAATTCAAAGTGGTAAACCTACATTTGATAAACAGATGTTCTCTAGCTAA	2337285		
Query 849	CGATGCCCTTTCAATTTTAGATGTTTATAATAAGGACTTCGGCAATGCA	897		
Sbjct 2337286	CGATGCCCTTTCAATTTTAGATGTTTATAATAAGGACTTCGGCAATGCA	2337334		

EK-5. *E. faecalis* strain CK135 plasmid pPD1, complete sequence (*asa1*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
587 bits(305)	1e-163	320/325(98%)	1/325(0%)	Plus/Minus
Query 4	AAAGCAGGA-CAGATATTTCTGCCACATTCTTTT	AGAAAAA	CAAGACAATAAAGACTTG	62
Subject 49643	AAAGCAGGAACAGATATTTCTGCCACATTCTTTT	AGAAAAA	CAAGACAATAAAGACTTG	49584
Query 63	ACGTTTACAATGAATCAAGCATTATTGGCAGCGTTAAATGAAGGAAGCAATAAAGTAGGC			122
Subject 49583	ACGTTTACAATGAATCAAGCATTATTGGCAGCGTTAAATGAAGGAAGCAATAAAGTAGGC			49524
Query 123	AAACAAGCTTGCTCTGTGTATCTGGAAGTCGAACGGATCAAAACAGGTGACGTAGAAAAT			182
Subject 49523	AAACAAGCTTGCTCTGTGTATCTGGAAGTCGAACGGATCAAAACAGGTGACGTAGAAAAT			49464
Query 183	ACGCAAAACAGAAAAC TACAACAAAGAGCTTGTTTCGTTCTAATACGGTGGTGACACACACA			242
Subject 49463	ACGCAAAACAGAAAAC TACAACAAAGAAC TTGTTTCGTTCTAATACGGTGGTGACGCATACA			49404
Query 243	CCTGATGATCCAAAACCAATCAAGCCGTTTATACAAAGAAAGGGGAAGACATTAAATCAT			302
Subject 49403	CCTGATGATCCAAAACCAACCAAGCCGTTTATACAAAGAAAGGGGAAGACATTAAATCAT			49344
Query 303	GGAAAAGTGGCTCGTGGTGATGTTC			327
Subject 49343	GGAAAAGTGGCTCGTGGTGATGTTC			49319

EK-6. *E. faecium* strain 515 chromosome, complete genome (*efaAfm*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1236 bits(643)	0.0	645/646(99%)	0/646(0%)	Plus/Plus
Query 13		AGCGATGCAGATGTTATTTTATACAACGGTTTGAATCTTGAAACAGGTAACAGCTGGTTC		72
Sbjct 2492097		AGCGATGCAGATGTTATTTTATACAACGGTTTGAATCTTGAAACAGGTAACAGCTGGTTC		2492156
Query 73		GATAACTTGATGGAAACGGCTAAAAAGAAGAAGGAAAAGATTATTTTGCAGTTAGCAAA		132
Sbjct 2492157		GATAACTTGATGGAAACGGCTAAAAAGAAGAAGGAAAAGATTATTTTGCAGTTAGCAAA		2492216
Query 133		AATGTAGAACCTCTTTATTTAACTAGCGGTGAAGAACATACAAAAGCAGATCCCCATGCT		192
Sbjct 2492217		AATGTAGAACCTCTTTATTTAACTAGCGGTGAAGAACATACAAAAGCAGATCCCCATGCT		2492276
Query 193		TGGCTAGACATATCTAACGGAATAAAATATGTGGAGGAAATCGCACGTATATTCTCTGAA		252
Sbjct 2492277		TGGCTAGACCTATCTAACGGAATAAAATATGTGGAGGAAATCGCACGTATATTCTCTGAA		2492336
Query 253		AAAGATGCAGAAAATGCGACACTCTATAaaaaaaTGCAGAAGCATATGTGGAAAACTA		312
Sbjct 2492337		AAAGATGCAGAAAATGCGACACTCTATAAAAAAATGCAGAAGCATATGTGGAAAACTA		2492396
Query 313		AAAGAATTAGATACACAAGCGAAGGAAAGTTTGTCTTATCGAAGAGAACAAAAATTA		372
Sbjct 2492397		AAAGAATTAGATACACAAGCGAAGGAAAGTTTGTCTTATCGAAGAGAACAAAAATTA		2492456
Query 373		TTAGTAACAAGTGAAGGGGCATTCAAGTATTTTTCACGAGCATATGATTTGCCAGCAGCT		432
Sbjct 2492457		TTAGTAACAAGTGAAGGGGCATTCAAGTATTTTTCACGAGCATATGATTTGCCAGCAGCT		2492516
Query 433		TATATATGGGAGATCAATACAGAAAGTCAAGGTACGCCGTATCAAATGAAAGCGATCATT		492
Sbjct 2492517		TATATATGGGAGATCAATACAGAAAGTCAAGGTACGCCGTATCAAATGAAAGCGATCATT		2492576
Query 493		GATCAGATAAGAGCAAAAGAAGTACCGGTTTTATTTCGTGGAAACCAGTGTAGACTCAAGA		552
Sbjct 2492577		GATCAGATAAGAGCAAAAGAAGTACCGGTTTTATTTCGTGGAAACCAGTGTAGACTCAAGA		2492636
Query 553		AGCATGGAACGGGTAGCAAAAGAAACGGGTTTGAAAATCTATGATAAACTGTTCACTGAT		612
Sbjct 2492637		AGCATGGAACGGGTAGCAAAAGAAACGGGTTTGAAAATCTATGATAAACTGTTCACTGAT		2492696
Query 613		TCCATAGCAAAAGAAGGAGAACAAGGAGATTCTTACTATCAGATGA		658
Sbjct 2492697		TCCATAGCAAAAGAAGGAGAACAAGGAGATTCTTACTATCAGATGA		2492742

EK-7. *E. faecium* strain N56454 chromosome, complete genome (*cob*)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
944 bits(491)	0.0	500/502(99%)	1/502(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTGGTTGTATCGATATCTGTTTCA- TTGTTTCAACTGGGATAGCTTCCCAGATTTTTTCG	59		
Sbjct 1313001	TTGGCTGTATCGATATCTGTTTCAATTGTTTCAACTGGGATAGCTTCCCAGATTTTTTCG	1313060		
Query 60	TTGACGATTCTTTCCATTTTCAGCTAATTCATCTGAAGTGATTTGACCAAAGTGGGTAAAG	119		
Sbjct 1313061	TTGACGATTCTTTCCATTTTCAGCTAATTCATCTGAAGTGATTTGACCAAAGTGGGTAAAG	1313120		
Query 120	TCGAATCGTAAATGTCCAGGAGCGACTAAAGAACCAGCTTGATTTGCATGCTCGCCAAGT	179		
Sbjct 1313121	TCGAATCGTAAATGTCCAGGAGCGACTAAAGAACCAGCTTGATTTGCATGCTCGCCAAGT	1313180		
Query 180	ACTTCTTTCAATGCCTTGTGCAGTAGATGGGTTGCTGTATGGTTTTTGATGATCCGATTG	239		
Sbjct 1313181	ACTTCTTTCAATGCCTTGTGCAGTAGATGGGTTGCTGTATGGTTTTTGATGATCCGATTG	1313240		
Query 240	CGCATCGATTGATCAATCAATAGATGATAGGTTTGCTCTTCACTCATTGGTGCTTTTACT	299		
Sbjct 1313241	CGCATCGATTGATCAATCAATAGATGATAGGTTTGCTCTTCACTCATTGGTGCTTTTACT	1313300		
Query 300	TCTACGGTGTGCATAAAATTGACCATTAGGCGCTTTTGAACATCTGTAACAACGCTACG	359		
Sbjct 1313301	TCTACGGTGTGCATAAAATTGACCATTAGGCGCTTTTGAACATCTGTAACAACGCTACG	1313360		
Query 360	ATTTGCGCTACTTCATTTCATGATCCATCCTTGATCCGCTACTTGCCCACTTCTGCA	419		
Sbjct 1313361	ATTTGCGCTACTTCATTTCATGATCCATCCTTGATCCGCTACTTGCCCACTTCTGCA	1313420		
Query 420	TAGAAAGGTGTTTGATCAAAGATCATTTGAGCTTCACCTTCTGCGACTTCATTCAAAGA	479		
Sbjct 1313421	TAGAAAGGTGTTTGATCAAAGATCATTTGAGCTTCACCTTCTGCGACTTCATTCAAAGA	1313480		
Query 480	GACTCACCTTTAACGATGACCA	501		
Sbjct 1313481	GACTCACCTTTAACGATGACCA	1313502		

EK-8. *E. faecium* strain V2937 chromosome, complete genome (ccf)

Score 910 bits(473)	Expect 0.0	Identities 477/479(99%)	Gaps 0/479(0%)	Strand Plus/Plus
Query 14		ACCATAAGAAATGCCCTTGTTTCAACTCTGGTACACGTGAAATAGATTGCCATAACGCCA		73
Sbjct 2894788		ACCATAAGAAATGCCCTTGTTTCAACTCTGGTACACGTGAAATAGATTGCCATAACGCCA		2894847
Query 74		TCAAGATTGGCATTGTACTAATAAAGGAAGACAACCAGCATATGGATTGACGCCATTTT		133
Sbjct 2894848		TCAAGATTGGCATTGTACTAATAAAGGAAGACAACCAGCATATGGATTGACGCCATTTT		2894907
Query 134		CTGCATATAAACGCTGCTGCTCTTCTCTTAACCTACTTTGTGTTTCCGGATCTCTTGAAC		193
Sbjct 2894908		CTGCATATAAACGCTGCTGCTCTTCTCTTAACCTACTTTGTGTTTCCGGATCTCTTGAAC		2894967
Query 194		TATATTGTTGCTGCAGTGCTTTTAAATTCGGTTGTAATTCTTGCGTTTTACGCATGCTCT		253
Sbjct 2894968		TATATTGTTGCTGCAGTGCTTTTAAATTCGGTTGTAATTCTTGCGTTTTACGCATGCTCT		2895027
Query 254		TTGTTTGGAAATGCATCAACGGCAATAGGATCACGCGGATGATCAGTGTAATAAAATGA		313
Sbjct 2895028		TTGTTTGGAAATGCATCAACGGCAATAGGATCACGCGGATGATCAGTGTAATAAAATGA		2895087
Query 314		TCCCTATCCCTGCATTACCAAATGACAACGCCTTGATCGCCTCAGCAAAGTAATAAACAA		373
Sbjct 2895088		TCCCTATCCCTGCATTACCAAATGACAACGCCTTGATCGCCTCAGCAAAGTAATAAACAA		2895147
Query 374		TATAACGATCCCAAATTCCTGTACTCTGTGCGCTGACTTCCCCAGTTCGCAACCGGATA		433
Sbjct 2895148		TATAACGATCCCAAATTCCTGTACTCTGTGCGCTGACTTCCCCAGTTCGCAACCGGATA		2895207
Query 434		AGACGATGACCAAACCTAACGATACCGGCCATCAGAAGTAAACGTTTGTACTTCTTCACT		492
Sbjct 2895208		AGACGATGACCAAACCTAACGATACCGGCCATCAGAAGTAAACGTTTGTATTCTTCACT		2895266

EK-9. *E. faecium* strain DMEA02 chromosome, complete genome (hyl)

Score 1775 bits(923)	Expect 0.0	Identities 1096/1155(95%)	Gaps 13/1155(1%)	Strand Plus/Plus
Query 41	ATGCTGCGCTTATCCAAAGCGTTTCTCTCGCTGCTGAA-TGTAACGTGTGTCTATTG			99
Sbjct 2878565	ATGCTGCAAAATATCCAAAGCGTTTCTCTCTGCTGAAATGCAGCTTTGTCAATCG			2878624
Query 188	GAGAATCGCTTTTTCGTCGTCACCTCTACTGCCGGCGTATCTACTTGT CAGTGTCAA			159
Sbjct 2878625	GAAAAATGCTTTTTCGTCGTCACCTCTACTGCCGGTGTATCTCTCTTGT CAGTTTCAA			2878684
Query 168	AATCATCTGAATCTACATTTGGATGAGGGACTA-TACTGTATTTGGTACGATGAAGGCTA			218
Sbjct 2878685	AATCG-CTGAACTACATTTGGCTGAGGGACAAATACTGT TTTGGTACGATGAAGGCTA			2878743
Query 219	AATGGCTTCCATATAATATGAACAGCAATCTATGATGAACCGTATGCTTTCTGTTCTTG			278
Sbjct 2878744	AATGGCTTCCATATAATATGAACAGCAATCGATAATGAACCGTATGCTTTCTGTTCTTG			2878803
Query 279	GGTATACATAGATTCGATCAGCTACTTCTTTTGCATCATGACGACTAATTCATCCACGA			338
Sbjct 2878884	GTT CAGCAGAGATTCGATCAGCTACTTCTTTTGCATCATGACGACTAATTCATCCACGA			2878943
Query 339	CCAAATCCGATTCATGAAAAACATCATGATGGGCGTCATAATAATAAGGTAAATTCG			398
Sbjct 2878864	CCAAATCCGATTCAGAAAAATGCATCATGATGGGCGTCGTAATAATAAGGTAAATTCG			2878923
Query 399	CCACGACTTTTAAACGSAAGCTCTTCATGAAATGTTCTCTTACTGCTGTTGATAAAATCCG			458
Sbjct 2878924	CCACGACTTTTAAACGSAAGCTCTTCATGAAATGTTCTCTTACGGCTGTTGATAAAATCCG			2878983
Query 459	TATT CAGAAATCTTGATGTATGATGGTCACATTGT CATAGGGTTCATCGTATCAGCCA			518
Sbjct 2878984	TCTT CAGAAATCTTGATGTATGATGGTCACATTGT CATAGGGTTCATCGTATCAGCCA			2879043
Query 519	ATACAGGGATCAACGATCATCAATCTCAATGCTACGACTTGCTTTGCATGCATCGCTA			578
Sbjct 2879044	ATACAGGGATCAACGATCATCAATCTCAATGCTACGACTTGCTTTGCATGCATCGCTA			2879103
Query 579	ATTGTTCTGTCAATGCGCCGATTCCTGGCCCAACTTCGATCACGTTCTGTTCTGTT CATCTA			638
Sbjct 2879104	ATTGTTCTGTCAATGCGCCGATTCCTGGCCCAACTTCGATCACGTTCTGTTCTGTT CATCTA			2879163
Query 639	TTTGCGCAGTTTCTACGATTTTCTTAAAAATTTGGTT CAGTGAGAAAAATTTTGCTTA			698
Sbjct 2879164	TTTGCGCAGTTTCTACGATTTTCTTAAAAATTTGGTT CAGTGAGAAAAATTTTGCTTA			2879223
Query 699	AACtttttttAGATGAACAACCATATTTCAATAAAATCTCTTTGTTCTACAGGGTGTCTG			758
Sbjct 2879224	AACtttttttAAATGAAAAACCATGTTCATAAAATCTCTTTGTTCTACAGGGTGTCTG			2879283
Query 759	CGATTT CACGAAATTCATCATGTTGTTCTCTCCACTATTTTCATTGCTTGTGCGAGCTCT			818
Sbjct 2879284	CGATTT CACGATATTCATCATGTTGTTCTCTCCACTATTTTCATTGCTTGTGCGAGCTCT			2879343
Query 819	TTTCGGCGTGATACGAAACATCTTCAAACGTTTTTCCAAATGTTTGCCGTTCTGATAACCG			878
Sbjct 2879344	TTTCGGCGTGATACGAAACATCTTCAAACGTTTTTCCAAATGTTTGCCGTTCTGATAACCG			2879403
Query 879	ATACGCAACTCATCACCTAGTTTTCTCGTTTTCTTTTGCTTGTGCTCCAGCTATTAAA			938
Sbjct 2879404	ATACGCAACTCATCACCTAGTTTTCTCGTTTTCTTTTGCTTGTGCTCCAGCTATTAAA			2879463
Query 939	CCATAGTCTAAAAGGCTTTGTCTAGTGATTCAGAAACAGCCGTTTGGGAAATGCTTGGC			998
Sbjct 2879464	CCATAGTCTAAAAGGCTTTGTCTAGTGATTCAGAAACAGCCGTTTGGGAAATGCTTGGC			2879523
Query 999	GTCACAACTTTTTCAATGCTTCTAAAAATAGCAGCATCACTTGATGTTCAACACCAAGA			1058
Sbjct 2879524	GTCACAACTTTTTCAATGCTTCTAAAAATAGCAGCATCACTTGATGTTCAACACCAAGA			2879583
Query 1059	CTTCCCCTTTTCTT--GGTTAGCTTGTGTACGCGGCAAAAAAGC-TGTTTAGCCTGAGG-			1114
Sbjct 2879584	CTTCCCCTTTTCTTGGTTTAGCTTGTGTACGCGGCAAAAAAGCATGTTTGCTTGAAGGA			2879643
Query 1115	ACAGC-TCCCTAAGGATTTTTCTAATTTTT--CCCCGAAAAATCA-GGTCGGT-AAAAACG			1169
Sbjct 2879644	ACAGCTTCCATAATGATTTTCTTATTTTTTCTCTGAAAAATCAGGGTCGGTAAAAACG			2879703
Query 1178	ATC-CCCCTCGAGTC	1183		
Sbjct 2879704	ATCACCCCTCGAGTC	2879718		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AHLATCI, Nur Seda
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1994, Ankara
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0507 376 20 97
 e-mail : ahlatcinursed@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2015
Lise	Nefise Andıçen Lisesi	2011

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019-Halen	Bome Trivitron San. Tic. A.Ş. (Halk Sağ. Gen. Müd.)	Biyolog
2015	Özel Eryaman Hastanesi	Stajyer

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Ahlatcı, N., Beyatlı, Y., Yuksekdağ, Z., (2018). Peynirden elde edilen potansiyel probiyotik *Enterococcus faecium* bakterilerinde yüzey antijeni ve seks feromon determinantlarının belirlenmesi, *The International Congress of Eurasian Natural Nutrition and Healthy*,585.

Hobiler

Yüzme, Dans , Keman



GAZİ GELECEKTİR..