

İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası

The nature of enterococcal biofilm structure, a risk factor for human and animal health

Maryam DIANI¹, Mohammad Nima ARIAFAR¹, Nefise AKÇELİK¹

ÖZET

Enterokoklar, genellikle normal bağırsak komensali olarak değerlendirilseler de aynı zamanda fırsatçı patojenlerdir ve sığır mastitisinin yanı sıra nozokomiyal kan dolaşımı, ameliyat bölgesi ve üriner sistem enfeksiyonu etkenleri arasında yer alan ilk üç bakteriden biridir. Enterokok türleri içerisinde *Enterococcus faecalis* insan ve hayvanlardaki enterokokal enfeksiyonların %80-90'ından sorumludur. Geriye kalan *Enterococcus* spp. enfeksiyonlardan sorumlu olan tür ise *Enterococcus faecium*'dur. Biyofilm yapısı; bir ya da daha fazla mikroorganizma türünün karbonhidrat bir matris ile bir arada tutulduğu, besinlerin taşınması ve atıkların uzaklaştırılması amacı ile su kanalları ihtiva eden yüksek organizasyonlu yapıdır. Biyofilm yapısı, ekzopolisakkarit ve protein film tabakası ile içerisinde bulunan mikroorganizmalar için bir kalkan görevi görür ve bu yapıdaki bakterileri öldürmek, planktonik formdaki bakterilere kıyasla çok daha zordur. Biyofilm yapısındaki bakterilerin fagositoz, antikor ve antibiyotiklere karşı 1000 kata kadar daha dirençli oldukları bilinmektedir. Enterokoklar; jelatinaz, agregasyon maddeleri, kapsül yapısı ve enterokokal yüzey proteini gibi biyofilm yapısına katılan çeşitli virülans faktörleri sayesinde insanları ve evcil hayvanları enfekte ederler. Ayrıca, tedavide kullanılan vankomisin gibi antimikrobiyal maddelere karşı daha dirençli olduklarından eradikasyonları oldukça zordur.

ABSTRACT

Enterococci, generally considered as normal bowel commensals, are also recognized as opportunistic pathogens and one of the top three bacteria which are the causes of bovine mastitis, nosocomial bloodstream, surgical site, and urinary tract infections as well. *Enterococcus faecalis* is the most common enterococci species, and it is responsible for 80-90% of human and animal enterococcal infections. *Enterococcus faecium* accounts for the remainder of infections caused by *Enterococcus* spp. Biofilms are highly organized structures formed by one or more microorganism species bound together by a carbohydrate matrix that contain water channels to deliver nutrients and removes wastes. Biofilm structure works as a shield with its exopolysaccharide and protein film layer and often harder to kill them than their planktonic counterparts. Biofilm bacteria are up to 1000 times more resistant to phagocytosis, antibodies and antibiotics. Enterococci can infect humans and domestic animals because of their many virulence factors associated with biofilm formation including gelatinase, aggregation substance, capsule formation, enterococcal surface protein. Furthermore, since they are also resistant against antibiotics such as vancomycin that used at treatment, it is really difficult to eradicate. Many strains of enterococci are resistant to one or more antibiotics and biofilms are thought to

¹ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Nefise AKÇELİK

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı, ANKARA

Tel : +90 312 222 58 20-2505 E-posta / E-mail : nefiseakkoc@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 16.03.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 26.05.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.48802

Diáni M, Ariafar MN, Akçelik N. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(1): 71-80.

Enterokok türlerinin çoğu en az bir antibiyotiğe karşı dirençlidir ve biyofilm yapısının bu dirence katkıda bulunduğu düşünülmüktür. Tüm dünyada oldukça önemli düzeyde enfeksiyona neden olan bu organizmanın eradikasyonunda daha etkin başarının eldesi için, biyofilm yapısının aşamalarının ve moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve bu yapı esas alınarak yeni ilaç dozlarının ve tedavi yollarının belirlenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus*, biyofilm, risk, virülans, antibiyotik

contribute to this resistance. In all over the world, to achieve better results at eradication of this organism; structure and molecular mechanism of biofilm need to be understood for determination of new drug dosages and new treatment strategies to eradicate biofilm.

Key Words: *Enterococcus*, biofilm, risk, virulence, antibiotic

GİRİŞ

Enterococcus cinsi; *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius*, *E. pseudoavium*, *E. flavescens*, *E. sulfurens*, *E. dispar*, *E. solitarius* ve *E. saccharolyticus* türlerini içermektedir. Enterokoklar, insan ve hayvanların bağırsak sistemlerinde ve çeşitli süt ürünlerinde hakim floranın bir bölümünü oluştururlar. Enterokoklar, genel olarak laktik asit bakterileri içerisinde yer alan bir bakteri grubu olup Gram (+), katalaz (-), oksidaz (-), fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan, hareketsiz, homofermantatif, diplokok ya da zincir görünümündeki bakterilerdir (1).

Enterokoklar; ağız florasında, insan ve hayvanların genital sisteminde ve bağırsak florasında doğal olarak bulunan fırsatçı patojenlerdir. Ayrıca üriner sistem, dolaşım sistemi, karın içi ve pelvik sistemler ve merkezi sinir sistemini enfekte etme özelliklerinin yanı sıra oluşturdukları biyofilm yapıları nedeniyle kalıcı hale gelmekte ve nozokomiyal (hastane orijinli) enfeksiyonlara neden olmaktadır (2, 3).

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polisakkarit bir matriks içine gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur. Değişik mikrobiyal türlerin, kendilerini

çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları bir mikro-ekosistemdir (4, 5).

Biyofilmler; kateterler, eklem ve kalp protezleri gibi tıbbi araçları veya kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda solunum yollarını kolonize edebilirler. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler (EPS), savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekzopolisakkaritler, bulunduğu bakteriyi enflamatuvar hücrelerin fagositozundan ve antibiyotik etkisinden korurlar. Bir biyofilmin yapısı %90 oranında su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarit, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta arasında zaman alır (5).

ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS

Enterokoklar, düşük virülanslı mikroorganizmalar olmalarına rağmen toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. Enterokoklar doğada; toprak, su, bitki, kuşlar böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada

bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. *E. faecalis* diğer enterokok türlerine göre dışkıda daha yüksek oranda bulunur. *E. faecalis* en yaygın bilinen tür olmakla birlikte, insan enterokokal enfeksiyonlarının %80-90'ından sorumlu olduğu belirtilmiştir (6). *E. faecium* ise geriye kalan enterokok cinsi enfeksiyonlarından sorumlu tutulan türdür (6, 7).

Bazı *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları tarafından üretilen sitolizin, insan ve hayvan eritrositleri için hemolizin aktivitesi gösterir. *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin ürettiği agregasyon maddesi, kalp kapakları ve renal hücrelere bağlanmasını kolaylaştırdığı belirlenmiştir. Ayrıca üriner sistem, dolaşım sistemi, karın içi, pelvik sistemler ve merkezi sinir sistemini enfekte etme özelliği olan yaygın nozokomiyal ajanları oldukları da bilinmektedir (8).

VİRÜLANS FAKTÖRLER

Genel olarak enterokoklar; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* gibi mikroorganizmalar kadar intrinsik virülansa sahip değildir. Orofarinkste kolonize olmalarına rağmen nadiren alt solunum yolu enfeksiyonlarına yol açarlar. Klasik bir virülans faktörü olmamasına rağmen enterokokların çok sayıda antimikrobiyal ajana dirençli olması, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalarda yaşamalarına ve çoğalmalarına imkan tanıyarak süper enfeksiyonlara yol açması ve özellikle glikopeptide dirençli suşların hastanede yayılması açısından bu suşlar üzerinde yapılan çalışmalara önem verilmiştir (9).

Enterokokların virülansında, genomda bulunan patojenite adaları ve plazmidlerde kodlanan virülans genleri rol oynar. Bu bakterilerin başlıca virülans faktörleri arasında; agregasyon faktörü (AF), enterokok yüzey proteini (ESP), hiyaluronidaz (HYL), hemolizin ve jelatinaz yer almaktadır (7, 10). Çalışmalar sonucunda enterokokal bakteriyemilerde %42-68 oranında mortalite bildirilmekle birlikte bu hastaların ileri derecede düşkün olması ve çoğunda

polimikrobiyal bakteriyemi bulunması nedeniyle, enterokokların mortalitedeki rolleri tam olarak tespit edilememektedir. Diğer çalışmalarda da enterokokların mortalitedeki rolleri %31-37 oranında saptanmıştır (11).

BİYOFİLM

Biyofilm; biyolojik bir oluşumdur ve değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (EPS) içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden; çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan mikroorganizmalardan oluşmaktadır (4). Biyofilm; üç boyutlu, EPS ile çevrelenmiş, su kanalları ve çok katlı bakteri tabakaları içeren bir yapıdır. EPS, kimyasal ve fiziksel olarak değişkenlik gösterir. EPS'nin ana bileşeni polisakkarittir ve yüksek seviyede su içermekle birlikte yapısında hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar bulunmaktadır (12).

EPS yapısında polisakkaridin yanısıra nükleik asit ve protein de bulunmaktadır. Bakteriler, bu matriksin içerisinde gömülü olarak bulunurlar. Fosil kayıtlarından elde edilen bilgiler üç milyar yıldan daha uzun bir süreden beri mikroorganizmaların biyofilm içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmıştır (13). Biyofilmler, biyotik veya abiyotik yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler yer alır. Bakteriler bir yüzeye tutunup biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden hafif durulama ile uzaklaştırılmazlar. Biyofilimde konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküller de bulunmaktadır. Biyofilm; su sistemlerinde, paslanmaz çelik borulardaki demiri indirgeyerek korozyon sebep olmakta ve borularda yeni tutunma yüzeyleri oluşmaktadır (14).

Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir. Biyofilimde bulunan bakterilerin sentezlediği polisakkaritler biyofilmin ana ekstraselüler komponentini oluşturur.

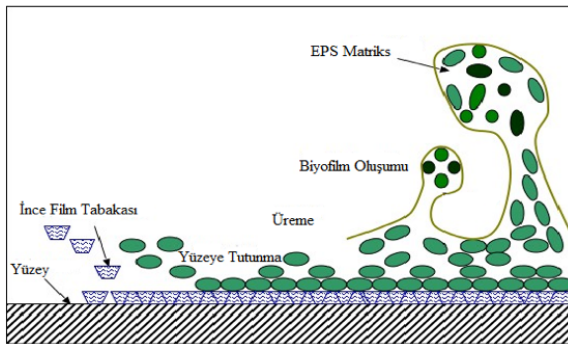
Bu matriksin içerisinde yaşayan organizmalara bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler gösterebilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (4).

Biyofilm, sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret değildir. Yapılan çalışmalar sonucunda bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel topluluklar oluşturduğu ortaya konmuştur (15). Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere besin maddelerinin ve oksijenin taşınmasına sağlayan su kanalları bulundurmaktadır ve çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler (16). Olgun biyofilm yapılar; %15 hücre, %85 matriks materyali tarafından oluşturulduğu ve hücrelerin, matrikslerinin çevrelediği farklı yüksekliklerdeki kuleler içerisinde buldukları anlaşılmıştır (17).

BİYOFİLM GELİŞİMİNİN AŞAMALARI

Biyofilm oluşumunu esas itibari ile dört ana evre altında incelemek mümkündür (18). Bu aşamalar sırasıyla (Şekil 1) (19);

1) İnce tabakanın oluşumu: Doğal ortamda mikroorganizmaların doğrudan bir yüzeye bağlı olmadıkları ve uygun yüzeyin üzerinde oluşan ince film tabakasına bağlandıkları bilinmektedir.



Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları (19).

2) Tutunma (mikroorganizmaların uygun yüzeye geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak tutunması): Biyofilm oluşumunun bu aşamasında bakteri hücreleri yüzeye tam olarak temas kurmamaktadır. Tutunmanın ilk aşaması olan geri dönüşümlü tutunmada bakteri hücresi ile yüzey arasında zayıf etkileşimler olarak bilinen elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri meydana gelmektedir. Bir önceki aşamada da bahsedildiği gibi yüzeye ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin payı çok büyüktür (20 - 22). Bu fazda olan bakteriler yüzeyin yakınındadır, ancak henüz yüzeye temas etmiş değildir. Mikroorganizmalar geri dönüşümlü tutunma aşamasında, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesinin olup olmadığını araştırırlar. Bu aşamadan sonra geri dönüşümsüz tutunma aşamasına geçilir.

3) Büyüme ve yüzey kolonizasyonu, mikrokoloni ve biyofilm oluşumu (fenotipik ve genotipik değişiklikler): Biyofilm oluşumunun bu evresinde tutunan bakteri gelişmeye başlar ve bir müddet sonra bölünür. Ayrıca bu aşamada EPS yapıda, diğer planktonik hücrelerin yakalanması da sağlanır. Bu aşamada ilk bakteri hücresi, tutunduğu yüzeyde koloni oluşturmaya başladıktan sonra aynı yüzeyde başka bakteriler de koloni oluşturmaya başlarlar. Böylece polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür. EPS senteziyle beraber, bakteriler oluşan EPS'nin içinde gömülü bir vaziyetle yaşamaya devam ederler. Bu durum bakterileri çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli kılar.

4) Biyofilm hücrelerinin kopması: Biyofilm içindeki bir bakterinin farklı bölgelerde kolonize olabilmesi için birtakım dağılıma mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak

tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilir (23).

MİKROORGANİZMALAR NEDEN BİYOFİLM YAPISI OLUŞTURURLAR?

Bakteriler in vitro ve in vivo ortamlarda biyofilm oluşturarak bir dizi avantaja sahip olurlar. Biyofilm yapısındaki bakteriler, planktonik bakterilere kıyasla antibiyotik, dezenfektan ve ısıya karşı daha dirençlidirler (24). Çevrenin zararlı etkilerinden korunmak, besin elde etme, yeni genetik özelliklerin kazanılması gibi faktörler mikroorganizmaların biyofilm yapıları oluşturma nedenleri arasında ön plana çıkmaktadır.

- **Çevrenin zararlı etkilerinden korunmak;** Farklı biyofilm topluluklarında ekzopolisakkarit matriksin çeşitli roller oynadıkları belirlenmiştir. EPS matriksi bir iyon değiştiricisi gibi davranarak çeşitli ajanların biyofilm içerisine girişlerini engeller, aynı zamanda UV ışığına, pH değişiklikleri, osmotik şok ve kuruma gibi çevresel streslerin zararlı etkilerinden korumada rol oynar. Doğal ve endüstriyel çevrelerde büyüyen biyofilmlerin; bakteriyofaj, amipler ve çeşitli kimyasal biyositlere karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Tıbbi alanda ise, hareketsiz bakteriyel hücreler konak savunma mekanizmalarına karşı koyabilmekte ve planktonik bakterilere göre, antibiyotiklere daha fazla dirençli olabilmektedirler. Biyofilm bakterilerinin, planktonik yaşayan aynı türdeki bakteriler oranla antibiyotik tedavisine 100 kat daha dirençli olabildiği bildirilmiştir (14). Ayrıca bakterilerin çevresindeki polisakkarit matriks (EPS), savunma sistemin hücrelerin ve makrofajları bakterilere ulaşmasını engeller (25).

- **Besin elde etme;** Biyofilm içerisinde su kanalları bulunmaktadır ve bu kanallar mikrokolonileri çevrelemekle birlikte yüksek geçirgenliğe sahiptirler ve primitif bir dolaşım sistemi gibidir. Bu sistem hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.

EPS, çevreden besin maddelerini (C - N - PO₄ gibi) bakterilerin kullanımını için konsantre eder (26).

- **Yeni genetik özelliklerin kazanılması;** Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle bakterilerin çoklu ilaç direnci kazanmasına imkan sağlar. Ayrıca biyofilm içerisindeki bakterilerin konjugasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkan tanır (4, 15).

Biyofilm oluşumu tesadüfi bir olay değildir. Bir araya gelen farklı türdeki bakteriler belirli bir ortak amaç taşırlar (14). Biyofilm yapısına örnek olarak sığır bağırsaklarındaki biyofilm yapısını göstermiştir. Bu biyofilimde bağırsaktaki selülozu sindirebilmek için en az beş farklı türde bakteri bulunmaktadır. Bakteriler, bu selülozun yıkımı için biyofilm içinde işbirliği halinde görev alırlar. Biyofilm ve selüloz arasındaki bölgede, selülozu glikoza dönüştüren *Fibrobacter succinogenes* bulunur. Bunun arkasında glikoza butirata dönüştüren *Butyrivibrio* spp. görev alır. Daha sonra bu bakterinin yanında bulunduğu ve başka bir türe ait olan bakteriler tarafından butirat, asetata çevrilir ve sonuçta asetate özelleşmiş metanojen bakteriler tarafından metana dönüştürülür. Bir koloni için artık maddesi olan, diğer koloni için besin olarak kullanılmaktadır. Bu bakteriyel işbirliğinin başka hedefleri de vardır. Metanojen bakteriler için oksijen toksik maddesidir. Bu nedenle biyofilm içerisinde bulunan metanojen bakterilerin oksijenden korunmaları gerekir. Metanojen koloninin etrafında bulunan beşinci bir bakteri türü bu korumayı sağlar. Bu tür hücresel etkileşimlerin tesadüf olarak ortaya çıktığı düşünmek oldukça güçtür (14).

ENTEROKOKLARIN BİYOFİLM OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Enterokokal enfeksiyonlar, antibiyotik direnci ve lateral gen transfer özellikleri açısından ciddi klinik tehditler oluşturmaktadır (27 - 29). Enterokoklar tarafından biyofilm oluşumuna katılan mekanizmalar ve faktörler halen kesin olarak aydınlatılamamakla birlikte, pek çok araştırmacının ilgisini çekmektedir (30).

E. faecalis'in de dahil olduğu Gram pozitif bakterilerde, karbonhidrat metabolizması biyofilm oluşumunu regüle edebilir (31, 32). Yapılan bir çalışmada, %1 oranında glikoz içeren Triptik Soy Broth (TSB) besi ortamında gelişen *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma oranının, glikoz içermeyen aynı besi ortamında gelişmesine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (33). Diğer bir çalışmada ise, besi ortamındaki glikoz konsantrasyonunun %0'dan %0,2'ye yükseltilmesinin *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma özelliğinde düşmeye neden olduğu belirlenmiştir (34). Yine aynı çalışmada, glikoz konsantrasyonunun %0,2'den, %0,5'e yükseltilmesi ile daha yüksek oranda biyofilm oluşumu saptanmıştır. Ayrıca *E. faecalis* OG1RF' in biyofilm oluşturmadaki artış, %1 oranında glikoz içeren TSB ile glikoz içermeyen TSB'de geliştirilen bakteri örneklerinde de görülmüştür (31). 61 adet *E. faecium* klinik örnekler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada, glikoz konsantrasyonu %0,25'ten %1'e yükselirken suşların biyofilm üretim miktarlarında artış gözlemlenmiştir. Glikoz konsantrasyonu %1,25 çıktığında, suşların biyofilm üretim miktarlarında azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada, suşların optimum biyofilm üretiminin %1 glikoz içeren ortamda 48 saat inkübasyon sonucunda gerçekleştiği rapor edilmiştir (35).

Yüksek glikoz konsantrasyonlarında enterokokal yüzey proteininin (Esp) biyofilm oluşumuna katıldığı bilinmektedir (36). Esp-pozitif olan iki farklı bakteri örneği; FA2-2 (pESPF) ve OG1RF (pESPF), bu gen bakımından negatif olan kontrolleri ile kıyaslandıklarında belirgin olarak daha yüksek oranda ve daha kalın biyofilm yapıları oluşturmuştur. Yine aynı çalışmada; gelişme ortamına \geq %0,5 oranında glikoz ilavesi *E. faecalis* E99'un biyofilm oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır (37).

Ozmotik basınçta meydana gelen değişiklikler *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma özelliği üzerinde etki gösteren bir diğer faktördür. Gelişme ortamının yüksek ozmolariteye (%2-3 sodyum klorür) maruz

bırakılması sonucunda; *E. faecalis*'in gelişmesinde bir değişimin meydana gelmediği, ancak biyofilm oluşumunun olumsuz yönde etkilendiği belirlenmiş, dolayısı ile *E. faecalis*'in çevresel değişimleri izleyerek özel koşullar altında biyofilm oluşumunu düzenlediği yorumu yapılmıştır (34).

Enterokoklarda fsm lokusu (kodlama mikrobiyal dahil olarak bilinen yapışkan matriks bileşenleri yüzey molekülü tanıyan MSCRAMM benzeri proteinler) ve esp geni (bir yüzey proteini kodlar) biyofilm oluşumundan sorumlu kolonizasyon veya virülans özellikleri olarak görev alırlar (38, 39).

ENTEROKOKLARDA PİLİ'NİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ

Esp, Ace, Fsr ve proteaz biyofilmin oluşumunda rol alırlar. Yüzeye yapışık olan ve ekstraselüler matriksin içine gömülü olan bakteri toplulukları yavaş üreme oranına, yüksek antibiyotik direncine ve yüksek yatay gen transfer özelliğine sahiptir (40). Enterokoklar pili yardımıyla konakçının dokularına bağlanabilirler. Bu doğrultuda konakçı hücrelerine sıkıca tutunması için bazı yüzey proteinleri (AS, Esp ve Ace) kullanılmaktadır (41, 42).

ENTEROKOKLARDA GELE'NİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ

E. faecalis jelatinazı (GelE), jelatin, kollajen ve kazein hidrolize edebilen bir ekstraselüler çinko metaloproteazdır. Jelatinaz ve serin proteaz (SprE) fsr lokusu tarafından kodlanan ve quorum-sensing sistemi tarafından regüle edilen gelE-sprE operonunda kodlanmaktadır (43). Peritonit (karın zarı iltihabı), endokardit (44), endoftalmit (gözün iç dokularının iltihabı) (45) ve in vitro translokasyon modellerinde kuvvetli bir şekilde virülansda etkisi olan jelatinazın, biyofilm oluşumunda da yüksek etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (34, 46 - 48).

ENTEROKOKLARDA FSR'NİN BİYOFİLM OLUŞUMUNDAKİ ROLÜ

Fsr lokusu, stafilokoklarda bulunan agr lokusuyla homologdur. *E. faecalis* regülatörü için fsrA, fsrB ve fsrC olarak tanımlanan üç geni içerir. fsrC'nin alt sentez yönünde, jelatinaz (metalloproteaz) için kodlayan gelE ve serin proteaz için kodlayan sprE olan iki ORF'dir (49). Bu lokus, virülansın ve metabolizmanın global regülatörüdür (50). Ayrıca bu bölge, *E. faecalis*'de jelatinaz ve serin proteazın ifadesi için bir pozitif regülatör olmasının yanı sıra fsrB ve fsrC genlerinin ifadesi için bir oto regülatördür (49).

E. faecalis'in diğer genleri olan epa, atn (51), bop (52), salA ve salB (53) biyofilm oluşumunda etkili oldukları gösterilmiştir. Birçok patojende biyofilm üretimi, quorum-sensing sistemi tarafından düzenlendiği görülmüştür. Bu kapsamda, *E. faecalis*'in biyofilm oluşumunda fsr'nin belirgin bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (31, 46, 47, 51).

SONUÇ

Hem insan ve hem de hayvanlarda dünya genelinde oldukça önemli enfeksiyonlara neden olduğu bilinen enterokoklar, biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm yapısı oluşturmak suretiyle kararlı hale gelmekte, fiziksel ve kimyasal muamelelere karşı biyofilm yapısı içerisinde planktonik hücrele kıyasla daha yüksek düzeyde direnç sergilemektedir. Günümüzde özellikle antibiyotik tedavilerinde, ilaç dozları belirlenirken biyofilm yapıları göz ardı edilerek, planktonik formlara göre düzenlemeler gerçekleştirilmektedir. Bu sebeple çoğu hastalığın tedavisinde, etken tamamen ortadan kaldırılamamakta ve hastalık devam etmektedir. İşte bu sorunların ortadan kaldırılması ya da azaltılması için biyofilm yapısının doğasının ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve yapısının her yönüyle anlaşılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Murcia JA, Collins MD. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 1991; 64: 69-74.
2. Murray BE, Weinstock GM. *Enterococci: new aspects of an old organism*. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999; 111: 328-334.
3. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2002; 1: 510-5.
4. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002; 8: 881-90.
5. Olson ME, Ceri H, Douglas W. Biyofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*, 2002; 66: 86-92.
6. Ira P, Sujatha S, Chandra PS. Virulence factors in clinical and commensal isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Pathol Microbiol*, 2013; 56: 24-30.
7. Jones M E, Draghi DC, Thornsberry C, Karlowsky JA, Sahm DF, Wenzel RP. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit - a European and North American Surveillance study 2000-2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2004; 3: 14.
8. Moellering RC. Jr: *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed, Philadelphia: Churchill Livingstone, 1999: 2411-241.
9. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 2008; 128: 111-21.

10. Seno Y, Kariyama R, Mitsuata R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*, 2005; 59: 79-87.
11. Edmond MB, Ober JF, Dawson JD. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: Natural history and attributable mortality. *Clin Infect*, 1996; 23: 1234.
12. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharites: A strong and sticky framework. *Microbiol*, 2001; 147: 3-9.
13. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2004; 12: 185-90.
14. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infection. *Science*, 1999; 284: 1318-22.
15. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000; 64: 847-67.
16. Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003; 129: 599-60.
17. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15: 167-93.
18. Palmer R Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol*, 1997; 5: 435-40.
19. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biofilm_Biofilm_Formation:Formation.jpg (Erişim tarihi: Nisan 2015)
20. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappinscott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995; 49: 711-45.
21. Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm Wiss u Techn*, 1999; 32: 321-6.
22. Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E, Ofek I. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect Immun*, 1981; 33: 29-33.
23. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1994; 284: 1318-22.
24. Kreft JU, Wimpenny JWT. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water Sci Technol*, 2001; 43: 135-41.
25. Hoiby N. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49: 235-8.
26. Fisher K, Phillips, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol*, 2009; 155: 1749-57.
27. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *Fems Microbiol Lett*, 1992; 72: 195-198.
28. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*, 2003; 348: 1342-1347.
29. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trens Microbiol*, 2005; 13: 34-40.
30. Carniol K, Gilmore MS. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Bacteriol*, 2004; 186: 8161-3.
31. Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Murray BE, Inouye RT. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 2004; 190: 967-970.
32. Marinho AR, Martins PD, Ditmer EM, d'Azevedo PA, Frazzon J, Van Der Sand ST, et al. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Braz J Microbiol*, 2013; 44: 423-6.
33. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Arciola CR, Montanaro L. Effect of iron limitation on slime production by *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001; 20: 343-5.

34. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2004; 186: 154-63.
35. Diani M, Gunay Esiyok O, Ariafar MN, Yuksel FN, Gunes Altuntas E, Akcelik N. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and *pfge* analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. *Afr J Microbiol Res*, 2014; 8(2): 129-37.
36. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, *Esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004; 72: 6032-9.
37. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 2006; 188: 2063-72.
38. Arias CA, Panesso D, Singh KV, Rice LB, Murray BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hylEfm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53: 4240-6.
39. Willems RJ, van Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol*, 2009; 4: 1125-35.
40. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*, 2007; 56: 1581-8.
41. Budzik JM, Schneewind O. Pili prove pertinent to Enterococcal endocarditis. *Invest*, 2006; 116: 2582-4.
42. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest*, 2006; 116: 2799-807.
43. Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol*, 2001; 183: 3372-82.
44. Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis*, 1998; 178: 1416-20.
45. Engelbert M, Mylonakis E, Ausubel FM, Calderwood SB, Gilmore MS. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun*, 2004; 72: 3628-33.
46. Mohamed JA, Singh KV, Huang W, Teng F, Murray BE. Influence of clinical origin and of various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In Program Abstracts of the 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, American Society for Microbiology, abstract B-821, p. 52, Washington, DC, 2003.
47. Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol*, 2004; 186: 5629-39.
48. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G, et al. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Organs*, 2006; 29: 402-6.
49. Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun*, 2000; 68: 2579-86.
50. Dunman PM, Murphy E, Haney S. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol*, 2001; 183: 7341-53.
51. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 2004; 72: 3658-63.

52. Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. J Infect Dis, 2004; 189: 420-30.

53. Mohamed JA, Teng F, Nallapareddy SR, Murray BE. Pleiotropic effects of 2 *Enterococcus faecalis* sagA-like genes, salA and salB, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. J Infect Dis, 2006; 193: 231-40.