

ENTEROKOK ENFEKSİYONLARINDA İMMÜNOPATOGENEZ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Orhan Baylan

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

ÖZET

Yakın zamana kadar virülansı düşük mikroorganizmalar olarak kabul edilen ve normal insan kommensalleri olan enterokoklar, artık fırsatçı patojenler olarak kabul edilmekte ve özellikle bağışıklık yetmezliği bulunan şahıslarda ciddi ve hayati tehdit eden enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Enterokoklar, birçok antimikrobiyal ajana karşı doğal veya kazanılmış direnç göstermeleri nedeniyle son yıllarda hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında üst sıralara yükselmişlerdir. Enterokokların sıklıkla hastane ortamlarında cansız yüzeylerde uzun süre hayatta kalmalarını ve yatarak tedavi gören hastalarda kolonize olabilmelerini sağlayan birçok özgül ve önemli özelliğe sahip oldukları yönünde gittikçe artan kanıtlar vardır. Bu özellikler, organizmaların çoklu ilaç direncini ve virülans faktörlerini kolaylıkla kazanımına bağlanmıştır. Enterokoklar arasında *Enterococcus faecalis* ve *E.faecium*, tıbbi olarak en önemli enterokoklar olup olguların %80-90'ında etken izolat *E.faecalis*'tir. Klinik enterokok izolatlarının virülans faktörleri hakkında

halen bilinmeyen birçok yön bulunmaktadır. Son zamanlarda dünyanın her yerinde nozokomiyal enterokok suşlarında artan çoklu ilaç direnci, özellikle virülans faktörleri olmak üzere enterokokların daha fazla araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu derlemede, bakterilerin ekzojen kazanımı, enterokoklar arasında genetik elemanların aktarımı, enterokok enfeksiyonlarına karşı kazanılmış konak bağışıklık yanıtı, virülans genlerinin ekspresyonu, enterokokların konak bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları ve enterokokların immünopatogenezinde önemli virülans faktörleri tartışılmıştır. Enterokokların virülans faktörlerinin ve konak bağışıklık yanıtının daha iyi anlaşılması, yeni tedavi ve profilaktik yaklaşımların gelişimine neden olabilir. Enterokokların insan mikrobiyotası içerisinde kommensal olarak varlığının ve non-enfeksiyöz davranışının desteklenmesi, enterokok enfeksiyonlarının etkin şekilde önlenmesi ve tedavisi için yeni bir strateji olarak görülebilir.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus*, enterokok enfeksiyonları, virülans faktörleri, immünopatogenez. *Nobel Med* 2019; 15(2): 5-16

VIRULENCE FACTORS AND IMMUNOPATHOGENESIS IN ENTEROCOCCAL INFECTIONS

ABSTRACT

Enterococci have until recently been accepted as low-virulent microorganisms. Although they are normal human commensals, they can act as opportunistic pathogens and cause serious and life threatening infections in especially immunocompromised individuals. Because of the fact that they have intrinsic and acquired resistance to many antimicrobial agents which is one of the most frequent isolated microorganisms from hospital-acquired infections in recently. There is increasing evidence that enterococci frequently have several specific important characteristics that allow them to survive for long periods on fomites in the hospital environments and colonize inpatients. All of these traits are attributed to the easy acquisition of multidrug resistance and virulence factors of the organisms. Amongst the enterococci, Enterococcus faecalis and E.faecium are medically the most important enterococci, with E.faecalis being the causative isolate in 80-90% of the cases. There

are still many unknown aspects about virulence factors of clinical Enterococcus isolates. Increasing multidrug resistance in nosocomial Enterococcus strains from all over the world recently enhances the need for further investigation of enterococci, especially the virulence factors. In this review, it was discussed exogenous acquisition of bacteria, transfer of genetic elements between enterococci, acquired host's immun response against enterococcal infections, expressions of the virulence genes, escape mechanisms from the host's immune system of enterococci and important virulence factors in enterococcal immunopathogenesis. A better understanding of the virulence factors of Enterococcus and host's immune response may cause to the progress of new therapeutic and prophylactic approaches. Supporting the existence of enterococci as commensal bacteria in human microbiota and their non-infectious behavior can be seen as a new strategy for effective prevention and treatment of enterococcal infections.

Keywords: Enterococcus, enterococcal infections, virulence factors, immunopathogenesis. **Nobel Med 2019; 15(2): 5-16**

GİRİŞ

Enterokoklar, 1970'li yıllardan önce bağırsağın zararsız kommensalleri veya klinik önemi az olan düşük virülanslı mikroorganizmalar olarak kabul edilmişlerdir.¹⁻⁶ Enterokokların laboratuvar hayvanlarına deri altı veya intraperitoneal yolla inokülasyonu sonrası bu hayvanlarda kronik veya ciddi enfeksiyonların görülmemesi, enterokokların nispeten virülan olmadıkları görüşünü desteklemiştir.⁴ Ancak ilerleyen yıllarda enterokokların, o kadar masum olmadıkları ve hastalarda kolonize olmalarını ve hastane ortamında uzun süre canlı kalmalarını sağlayan bazı özelliklerinin bulunduğu anlaşılmıştır. Bu avantajları arasında; birçok antibiyotiğe intrensek (doğal) olarak dirençli bulunmaları, barındırdıkları mobil genetik elemanları sayesinde virülans ve antibiyotiklere direnç genlerinin aktarımını kolaylıkla yapabilmeleri, çevreye adaptasyonlarının ve dış ortam koşullarına dayanıklılıklarının iyi olmaları sayılabilir. Enterokokların söz konusu avantajları nedeniyle son yıllarda toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardaki izolasyon oranlarında belirgin artış olmuş ve özellikle *Enterococcus faecium* türünde olmak üzere hastane kaynaklı izolatlarda glikopeptidler dahil birçok antibiyotiğe karşı direnç gelişmiştir. Sonuç olarak enterokoklar, tüm bilim çevrelerinde artık kesin olarak önemli nozokomiyal patojenler olarak kabul edilmektedir.¹⁻⁶

Enterokoklar; toprak, su, bitkiler, kuşlar, böcekler ve memelilerde bulunmakla beraber, esas olarak yerleştikleri bölgeler, insan ve sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemleri (GİS)'dir. İnfantların GİS'ine yerleşen ilk kolonizasyon üyelerindedir. Enterokoklar, aerop gram pozitif bağırsak mikrobiyotasının önemli kısmını oluşturmakta olup insan dışkısında 10^5 - 10^7 cfu/gram miktarında bulunurlar. Ancak normal bağırsak mikrobiyotasının çoğunluğunu zorunlu anaerob bakteriler oluşturduğundan enterokokların tüm bağırsak mikrobiyotasındaki oranı, %0,01'den azdır. İnsanlarda ayrıca daha az sıklıkta olmak üzere vajina, deri, oral kavite ve dental plaklarda da saptanırlar.^{4,7,8}

Enterokoklar, antibiyotik direnci ve virülansla ilişkili yeni genetik materyalleri kazanabilme yetenekleri sayesinde ve konakta belirli predispozan durumların bulunması halinde, bağırsak dışı bölgelerde kolaylıkla kolonize olmakta ve alışılmışın dışındaki bölgelerde enfeksiyon oluşturabilmektedirler.¹ Enterokoklar; üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) başta olmak üzere, kan dolaşımı enfeksiyonları, enfektif endokardit, intraabdominal enfeksiyonlar, pelvik enfeksiyonlar, doku ve yara yeri enfeksiyonları, yanık enfeksiyonu, yabancı cisim enfeksiyonları, nadiren sinir sistemi enfeksiyonu, kulak ve göz enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, pnömoni, periodontit ve sinüziti bulunan olgulardan izole edilebilmektedirler.^{4,7-9}

Enterokok enfeksiyonlarının %60'ı, hastane kaynaklı olup bunların yaklaşık yarısının geniş spektrumlu antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı yoğun bakım ünitelerinde meydana geldiği ileri sürülmektedir.⁷ Enterokoklar, günümüzde Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde hastane kaynaklı enfeksiyonlarda dördüncü, hastane kaynaklı ÜSE ve yara yeri enfeksiyonlarında ikinci, bakteriyemilerde ise üçüncü sıklıkta izole edilen bakterilerdendir.^{4,9} ABD'de bütün hastane enfeksiyonlarının %10'unda, bakteriyemilerin %9'unda ve hastane kaynaklı ÜSE'lerin ise yaklaşık %16'sında etkendirler.⁷ Enterokoklar, ABD'de tüm bakteriyel enfektif endokardit olgularının %20'sinden sorumlu olup bu olguların %90'ından fazlasında etken, *E.faecalis* türüdür.⁵

Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının %80-90'ını *E.faecalis*, kalan kısmın çoğunu ise *E.faecium* oluşturur. *E.faecium*, *E.faecalis*'e oranla antimikrobiklere daha dirençlidir. Özellikle hastane ortamında *E.faecium* türü, diğer türlere göre daha baskın görülmektedir.^{2,10} Aynı zamanda özellikle hastane enfeksiyonlarında çoklu ilaca dirençli (ÇİD) *E.faecium* izolatlarında sürekli bir artış izlenmektedir. *E.gallinorum*, *E.casseliflavus*, *E.durans*, *E.avium*, *E.mundtii*, *E.malodoratus*, *E.raffinosis*, *E.solitarius*, *E.flavescens* ve *E.hirae* gibi diğer enterokok türleri, klinik örneklerden ender olarak izole edilir. *E.sulfureus*, *E.malodoratus* ve *E.pseudoavium* türleri ile atipik enterokoklar olarak isimlendirilen ve PYR (L-pirolidonil-β-naftilamid) testi negatif olan *E.cecorum*, *E.columbae* ve *E.saccharolyticus* türleri ise insanlardan henüz izole edilmemişlerdir.^{2,4}

Enterokokların Ekzojen Kazanımı

Uzun yıllardır, enfeksiyona neden olan enterokokların, hastanın kendi endojen mikrobiyotasından kaynaklandığına inanılmıştır. Ancak yapılan son klinik araştırmalar, enterokokların ve enterokok plazmidlerinin hastalar arasında transfer edilebildiğini göstermiştir. Ayrıca enterokok klonlarının, çevreye adaptasyonlarının ve dış ortam koşullarına dayanıklılıklarının yüksek olması nedeniyle yıllar boyunca hastane ortamında endemik kalabildikleri ve salgınlara neden oldukları anlaşılmıştır. Birçok çalışmada ortaya çıkan önemli sonuç, enterokok enfeksiyonu gelişmeden önceki safhada hastalarda anti-enterokokkal aktivitesi bulunmayan parenteral antibiyotiklerin kullanılmış olmasıdır.⁴

Ekzojen enterokok suşlarının kolonize olma, çoğalma ve konak dokularına yayılma yeteneklerinin, endojen enterokoklara kıyasla daha güçlü ve kalıcı

olduğu ileri sürülmektedir. Bu gibi üstünlükleri kazandıran pek çok virülans faktörü vardır. Bu faktörler, bu fenotipleri göstermeyen endojen suşlara kıyasla, ekzojen suşlara seçici avantajlar sağlayan güçlü bakteriyosinlerdir. Bu gibi bakteriyosinleri üreten ekzojen hastane suşları, GİS'in mikrobiyal kolonizasyonunun direncini azaltan antibiyotikleri kullanan hospitalize hastalarda, seçici değişim ile endojen enterokok mikrobiyotasının yerini alabilir.⁴

Enterokoklar Arasında Genetik Elemanların Aktarımı

Enterokokların, mobil genetik materyalini hem kendileri hem de diğer cinsler arasında aktarabilmesi gibi güçlü ve eşsiz yetenekleri vardır. Virülans faktörlerinin kazanımı, çoğunlukla multifaktöriyeldir. Enterokokların virülansında, virülans genlerini içeren ekstrakromozomal elemanlar (dar ve geniş konak aralığına sahip plazmidler, seçici olmayan transpozonlar ve bakteriyofajlar) ve genom üzerinde farklı bölgelerde bulunan patojenite adacıkları etkindir.^{1,4,11,12} Virülans genlerinin mikroorganizmalar arasında aktarımı, mikroorganizmaların çoğalması ve transferi için gerekli olanların dışında ayrıca bakterilere, uygun olmayan dış ortamlarda canlı kalmalarını sağlayan özellikleri de kazandırmaktadır. Bu özellikler arasında; antibiyotik veya ağır metal direnci, bakteriyosin aktivitesi, alışılmadık substratların metabolizması ve virülans faktörlerinin kazanımı sayılabilir. Bu nedenle doğal gen aktarım mekanizmaları, temel olarak virülansın bir ekspresyonudur.⁴

Enterokoklara Karşı Gelişen Konak Bağışıklık Yanıtı ve Enterokokların Gelişen Konak Bağışıklık Yanıtından Kaçışı

Enterokoklara karşı gelişen konak bağışıklık yanıtını araştıran çalışmaların çoğu, *E.faecium* türü üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin sağlıklı farelerde oluşturulan öldürücü olmayan bir *E.faecium* peritonit modelinde peritona hızlı bir nötrofil göçü görülmüş ve ardı sıra periton ve sistemik enterokok yükünde hızlı bir azalma saptanmıştır. *E.faecium* peritonitinde; peritoneal makrofajların yüzeyindeki Toll benzeri reseptör 2 (TLR2) tarafından bakterinin tanınması, ardından MyD88 aracılığıyla sinyal gönderilmesi ile peritoneal makrofajların ve nötrofillerin akışı ve kompleman ile bakterilerin opsonizasyonu sonucunda erken dönemde enfeksiyon sınırlandırılmıştır. Bu durum, farelerde *E.faecium* enfeksiyonlarında TLR'ler, nötrofiller, makrofajlar ve kompleman sistemi dahil normal bağışıklık sisteminin farklı bileşenlerinin önemli

rol oynadıklarını göstermektedir. Bu hücrelerin ve moleküllerin tükenmesi, *E.faecium*'un periton yükünde uzun süreli bir artışa ve peşi sıra daha ciddi sistemik enfeksiyonların gelişimine neden olmaktadır. Bağışıklık sisteminin çalışması sonunda tüm farelerin bakterilerinden temizlenmesi ilginç bulgudur. Sağlıklı konak bağışıklık sisteminin bileşenlerinden birinin eksikliği, enfeksiyonun temizlenemeyeceği anlamına gelmemekte; eksiklik, bağışıklık sisteminin diğer sağlam bileşenleri tarafından kompanse edilebilmektedir. Bu durum, bağışıklık sistemi sağlam konaklarda *E.faecium*'un ılımlı düzeyde virülan nitelik gösteren klinik tablolar oluşturmasını açıklayabilir.³

Ancak enterokokların da, oluşan konak bağışıklık yanıtından etkilenmemek için geliştirdikleri konak bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmaları bulunmaktadır. Bu kaçış mekanizmaları, enfeksiyon patogenezinde önemli yer tutmaktadır. Örneğin agregasyon maddesi (As) bulunan enterokoklar, kompleman reseptörü tip 3 aracılığıyla opsonizasyondan bağımsız olarak nötrofillere bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma sonucunda, nötrofillerin bakterileri öldürmesi engellenir ve bakterilerin hücre içi sağ kalımları artar.¹³ As, ayrıca enterokokun yüzey hidrofobitesini artırarak lizozomal vezikül ile fagozomun birleşmesini güçleştirir. Süper antijen aktivitesine sahip olan As, T hücre proliferasyonunu ve proliferen T hücrelerinden TNF- β , IFN- γ ve makrofajlardan TNF- α salınımını yayarır.^{1,3,11}

Diğer yandan çoğu *E.faecalis* ve bazı *E.faecium* türleri tarafından sentezlenip hücre dışı mikroçevreye salınan süperoksitler, bakterilerin hayat süresini uzatır. Bakteriyemi veya endokarditli hastalardan izole edilen enterokok izolatlarının, dışkı kökenli izolatlardan daha yüksek oranda süperoksit radikali ürettiği gösterilmiş ve bu nedenle süperoksit üretimini, virülanla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. *S.aureus* ve *Nocardia asteroides* gibi pek çok gram pozitif mikroorganizma, hayatta kalma şanslarını artırmak amacıyla fagolizozomlarda bulunan süperoksit ve hidrojen peroksiti katalize edebilirler. Enterokoklar, katalaz negatif olmalarına rağmen hidrojen peroksidi etkisiz hale getirebilmek amacıyla NADH peroksidaz içeren bir flavin üretirler. Enterokoklar ayrıca, süperoksitin hidrojen peroksit dönüşümünü engelleyen süperoksit dismutaz enzimine sahiptirler.^{3,11,14}

Enterokok yüzey proteininin iç kısmındaki bir bölge, tekrarlayan birimlerden oluşmaktadır. Bu bölge, moleküle uzayıp kısalma özelliği

kazandırarak bakterinin bağışık yanıtın kaçışını kolaylaştırmaktadır.^{12,15} Enterokokların virülan faktörlerinden olan sitolizin (Cyl), makrofaj ve polimorfonükleer lökositler (PMNL'ler) üzerinde litik etki göstererek bakteriyi bağışıklık sisteminden korumaktadır.^{12,16} Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, *E.hirae* ATCC 9790 suşuna ait lipoteikoik asit (LTA)'in bakteri otolizisini inhibe ettiği gösterilmiştir. *E.faecalis* ve diğer bazı gram pozitif bakterilerde LTA, immünomodülatör gibi rol oynayarak PMNL'den TNF- α , IL1- β , IL6, IL8 ve PGE-2 gibi enflamatuvar mediyatörlerin, süperoksit radikallerin ve lizozomal enzimlerin salınımını artırır.¹⁷ Kapsül bileşenleri de, kompleman aktivasyonunu engelleyerek bakterilerin kompleman aracılı opsonofagositoza direnç göstermelerini sağlar. Bu durum, bakterilerin konak bağışıklık sistemi tarafından tanınmamasına ve bakterilerin konak bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olur.^{3,11}

Patogenez

Adezyon ve Dokulara Yayılım

Enterokok enfeksiyonlarının patogenezinde birinci ve en önemli adım; enterokokların, özgül bağlanma aracı olarak yüzeylerinde bulunan adezinleri ile konağın epitel/endotel hücre reseptörlerine veya hücre dışı matriks proteinlerine tutunması, yani adezyondur. Enterokok adezinleri ile ilgili araştırmalar, son yıllarda artış göstermiştir. GİS'de adezinleri olmayan enterokoklar, konak hücre reseptörlerine tutunamadıklarından bağırsak motilitesi ile luminal içerik içinde sindirim sisteminden uzaklaştırılır. Kommensal bakterilerde bulunan adezinler, konak hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanmayı sağlayarak kolonizasyonun sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadırlar.^{3,4,9,11,17}

Guzman ve ark., enterokoklarda yüzey karbonhidrat adezinlerinin varlığını gösteren ilk araştırmacılarıdır.¹⁸ Araştırmacılar, ÜSE'li hastalardan izole ettikleri *E.faecalis* suşlarının, *in vitro* ortamda idrar yolları epitel hücrelerine etkin şekilde yapıştıklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca endokarditli hastaların kanlarından izole edilen *E.faecalis* suşları, Girardi Kalp insan hücre dizisine etkin şekilde yapışmış ve serum varlığında üretildiklerinde kalp hücre dizisine yapışmaları artmıştır.¹⁸

Enterokokların membran glikolipidleri, sitoplazma ve çevre arasında geçirgen bir tabakanın oluşumunda rol alırlar ve aynı zamanda birçok gram pozitif bakteride LTA'nın tutunma yeri olarak işlev görürler. Membran glikolipidlerinin, insan kolon

mukozal hücrelerinin yüzeyinde ve/veya hücre dışı matrikste bulunan heparin ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikanları özgül olarak tanıdığı ve bunlara bağlandığı, dolayısıyla bakterilerin konak dokularına adezyonunda önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir.³

Kolonizasyon sürecinden dokulara yayılım sürecine geçen enterokoklar, kolonizasyon alanlarından çok daha farklı, daha yüksek redoks potansiyeline sahip, temel besin maddelerinin sınırlı olduğu, fagositik lökositlerin ve diğer konak savunma sistemlerinin bulunduğu bir çevre ile karşılaşılır. Patojen enterokoklar, muhtemelen bu alternatif çevresel koşullar altında üremeyi destekleyen genleri ekprese ederler.⁴

Biyofilm Oluşumu

Enterokokların konak dokularına adezyonları yanısıra biyofilm oluşturmaları, enfeksiyonların patogenezinde oldukça önemlidir. Biyofilm, canlı (kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda solunum yollarında) veya cansız (vücutta bulunan kateterler, eklem ve kalp protezleri gibi tıbbi gereçler üzerinde) yüzeylere yapışarak kendi ürettikleri ekzopolisakkarit bir matriks içinde gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları mikroekosistem topluluğudur. Enterokoklar, biyofilm yapısı oluşturarak ekzopolisakkaritlerin etkisi ile kararlı hale gelmekte, enflamatuvar hücrelerin fagositozundan korunmakta, besin kaynaklarını daha verimli kullanmakta, fiziksel ve kimyasal çevre etkenlerine karşı planktonik hücrelere kıyasla daha dirençli olmaktadır. Günümüzde özellikle antibiyotik tedavilerinde ilaçların dozajları belirlenirken biyofilm yapıları göz ardı edilmekte, planktonik bakterilere göre düzenlemeler yapılmaktadır. Bu sebeple çoğu hastalığın tedavisinde etken tamamen ortadan kaldırılamamakta ve hastalık devam etmektedir.^{3,4,19}

Enterokoklar tarafından biyofilm oluşumuna neden olan mekanizmalar ve faktörler, halen kesin olarak aydınlatılamamakla birlikte, bu konu pek çok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Adezyon ve biyofilm oluşumunun, birbiriyle uyumlu birden çok bakteriyel faktörün katılımını gerektiren karmaşık bir mekanizma olduğu yönündeki görüş giderek daha fazla kabul görmektedir. Bu karmaşıklık, biyofilm oluşumunu belirleyen faktörlerin bireysel rolü üzerine odaklanmış çalışmaların yorumlanmasını güçleştirmektedir. Örneğin adezyon ve biyofilm oluşumunda, çevresel üreme koşulları etkilidir.¹⁹ Üreme ortamına $\geq 0,5$ oranında glikoz ilavesi,

E.faecalis E99'un biyofilm oluşumunu önemli ölçüde artırmıştır.²⁰ Üreme ortamının yüksek ozmolariteye (%2-3 NaCl) maruz bırakılmasının, *E.faecalis*'in üremesinde bir değişime neden olmadığı, ancak biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilediği belirlenmiş; dolayısıyla *E.faecalis*'in çevresel değişimlerden etkilenecek biyofilm oluşumunu düzenlediği yorumu yapılmıştır.²¹

Virülans Faktörleri

Agregasyon Maddesi (As)

Agregasyon maddesi (aggregation substance=As), enterokokların konak hücrelerine yapışmasında önemli rol oynayan bir grup yüzey adezin glikoproteinidir. As, enterokokların hücre duvarından saç kümeleri şeklinde uzanır. As oluşumuna neden olan agg geninin, indüklenebilir ve feromonlara duyarlı konjugatif plazmidlerde ve patojenite adacıklarında çeşitli varyantları bulunmaktadır. Bunlar pPD1, pCF10, pAD1 plazmidlerinde bulunan sırasıyla asp1, prgB ve asal ile patojenite adacığında bulunan asc10 gen varyantlarıdır. asal geni tarafından kodlanan Asa1, asp1 geni tarafından kodlanan Asp1, prgB ve asc10 genleri tarafından kodlanan Asc10, en çok incelenen As glikoproteinleridir ve bu glikoproteinler, %90'ın üzerinde aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. Plazmidlerdeki As sentezinden sorumlu genlerin oldukça iyi korundukları anlaşılmaktadır.^{3,4,5,22}

As'nin, gram pozitif bakterilerin hücre duvarı ile ilişkili proteinlerine benzer şekilde bakteri hücresi membranındaki C-terminaline bağlanmış olduğu görülür.⁴ Asc10 ve Asa1, enterokokların birçok hücre dışı matriks proteinine yapışmasını sağlamaktadırlar. Asc10, PMNL'lerde internalizasyonu ve hücre içi sağkalımı artırmaktadır.³ Bir tavşan endokardit modelinde;Asc10gibi,Asa1'inde*E.faecalis*'in virülansını artırdığı saptanmıştır.²³ Asa1, enterokokların böbrek tübüler hücrelerine ve insan makrofajlarına yapışmayı ve bu hücrelerde sağkalımı artırmıştır. Ancak As'nin, bir fare ÜSE modelinde virülansa katkıda bulunmadığı gösterilmiştir.²⁴ Bununla birlikte As proteinlerinin, *E.faecalis*'in bağırsak epiteline translokasyonunu sağlayarak sistemik enfeksiyona neden olabileceğinin göstergesi olarak kültüre edilmiş farklı bağırsak epitel hücrelerinde bakteriyel internalizasyonu kolaylaştırdığı ortaya konmuştur.³

Verici bakterinin yüzeyini potansiyel alıcı hücrelere yapışkan hale getiren As, enterokokların birbirleriyle sıkı temas etmelerini sağlar ve böylece bakterilerin agregasyonuna neden olur. Bakterilerin bu kümelenmesi, antibiyotik direnç ve virülans

genlerini taşıyan plazmidlerin konjugasyonla transferini kolaylaştırır. As'nin, ayrıca enterokokların konak hücreye adezyonuna neden olması nedeniyle *E.faecalis* enfeksiyonlarının başlangıcında rol oynadığı düşünülür. Sistemik enfeksiyonların gelişmesini kolaylaştıran As'de bulunan Arg-Gly-Asp (arjinin-glisin-aspartik asit asit) aminoasit (RGD) motiflerinin, ökaryotik hücre reseptörlerini (integrinleri) taşıyan bağırsak epiteli, nötrofil, endokardiyal vejetasyonlar ve böbrek tübüler hücrelerinin yüzeylerine bağlanması ile bakterinin adezyonunu sağlama ve hücre yüzey hidrofobitesini artırma özelliklerinin yanısıra enterokoklar arasında konjugasyon sırasında hücre-hücre teması düzenleme ve plazmid geçişini kolaylaştırma gibi özellikleri ile virülansa katkıda buldukları kabul edilir. Bir virülans faktörü olarak As'nin, adezyon ve agregasyona neden olması yanısıra ayrıca konak savunmasına karşı koruyucu faktör olarak da görev yaptığı anlaşılmaktadır.

Chow ve ark., 1993 yılında hemolizin ve/veya Asal proteinlerini eksprese eden *E.faecalis* suşlarını değerlendirmek üzere bir tavşan endokardit modeli üzerinde çalışmışlardır.²⁵ Araştırmacılar, mortalite oranını, hemolizin ve Asal pozitif grupta %55, hemolizin negatif Asal pozitif grupta %15, hemolizin pozitif Asal negatif grupta ise %0 olarak saptamışlardır. Ayrıca, Asal pozitif suşların oluşturdukları vejetasyonların ağırlıkları, 181-209 mg arasında değişmekte iken Asal negatif suşların oluşturdukları vejetasyonların ağırlıkları, 81-92 mg arasında değişmiştir.²⁵ Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda As içeren enterokokların pulmoner ve miyokardiyal yıkıma yol açarak daha mortal seyrettiği gösterilmiştir. As, özellikle *E.faecium*'a göre daha sık katater enfeksiyonlarına neden olan *E.faecalis* izolatlarına katatere tutunma yeteneği kazandırmaktadır.^{8,26,27} Guzman ve ark., ÜSE'li hastalardan izole ettikleri *E.faecalis* suşlarının in vitro ortamda üriner sistem epitel hücrelerine yapıştığını göstermişler ve bu yapışmadan bakteri hücre duvarında bulunan As gibi antijenlerin sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir.²⁸ As'nin bilinen ayrıntılı özelliklerinin aksine, enterokokların konak dokularına yapışmasını teşvik eden diğer faktörler hakkındaki bilgiler sınırlıdır.⁴

Enterokok Yüzey Proteini (Esp)

Enterokok yüzey proteini (enterococcal surface protein=Esp), ilk olarak gentamisine dirençli bir *E.faecalis* izolatında tanımlanmıştır. Esp, *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinde bulunan patojenite adacıklarında mevcut esp geni tarafından kodlanır.

Esp, hücre duvarı ile ilişkili bir protein olup 153 kb büyüklüğünde yüksek moleküler ağırlığa sahiptir.^{3,11,12,29} esp gen ekspresyonunun, çevresel koşullardaki değişikliklerden etkilendiği, genin en fazla 37°C'de ve anaerobik koşullar altında eksprese edildiği gösterilmiştir.³

Esp üretimi ve biyofilm oluşumu ilişkisi konusunda yapılan bazı çalışmalarda Esp'nin, silikon, polistiren ve florotilen gibi cansız yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol oynadığı ortaya konmuştur.^{10,17} Esp'si eksik *E.faecalis* mutantlarının, biyofilm oluşturmada belirgin kayıp yaşadığı saptanmıştır.³⁰ esp geni pozitif bakteriler, bu gen bakımından negatif olan kontrolleri ile kıyaslandıklarında belirgin olarak daha yüksek oranda ve daha kalın biyofilm yapıları oluşturmuşlardır.²⁰ Heikens ve ark., *E.faecium* Esp'sinin, biyofilm oluşumunda yer aldığını ve endokardit, ÜSE ve bakteriyemi patogeneze katkıda bulunduğunu deneysel olarak göstermiştir.¹⁵ Ancak aksine bazı çalışmalarda, klinik *E.faecium* izolatlarındaki esp geninin varlığı ya da yokluğu ile biyofilm oluşumu arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır.^{19,31}

Esp'nin, özellikle *E.faecalis* olmak üzere enterokokların üriner sistem epiteline tutunmalarında ve tutundukları yüzeylerde kalıcı şekilde kolonize olmalarında etkin bir faktör olduğu gözlenmiştir. Esp'nin, bir kolonizasyon faktörü gibi karboksiterminal ucuyla musin veya uroplakin gibi mesane duvarı komponentlerine *E.faecalis*'in bağlanmasını sağlayarak ÜSE'lere neden oldukları ve persistansa katkıda buldukları gösterilmiştir.^{3,9,10}

Esp, bakteriyemi ve endokardite neden olan *E.faecalis* ve özellikle epidemik vankomisine dirençli olanları dahil olmak üzere *E.faecium* izolatlarında yüksek oranda bulunurken dışkı kökenli ve çevresel izolatlarda nadiren saptanmaktadır. Esp'nin, *E.faecalis* izolatlarında yaygın olmasına rağmen, hastane kaynaklı *E.faecium* izolatlarında daha sık gözlenmesi, Esp'nin virülansda önemli rol oynadığını düşündürür. Salgına neden olan *E.faecalis* ve *E.faecium* izolatlarında esp geni yüksek oranda tespit edildiğinden dolayı, esp geninin epidemik suşları gösteren önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir.^{3,10,12,15} Esp'nin ancak peritonitte ve GİS kolonizasyonunda özel bir rolü bulunmamıştır.³

Enterokokların Adeziv Matriks Moleküllerini Tanıyan Kollajen Bağlayıcı Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri (MSCRAMM)

Enterokokların insan dokularında kolonizasyonunun, konağın hücre dışı özgül matriks proteinleri

ile enterokokların yüzeyinde bulunan hücre çeperi bağlantılı Adeziv Matriks Moleküllerini Tanıyan Kollajen Bağlayıcı Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri (collagen binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule=MSCRAMM'ler) arasındaki etkileşim sonucu gerçekleştiği varsayılmaktadır. *E.faecalis* V583 ve *E.faecium* TX0016'nın saptanan açık genom dizileri, sırasıyla 17 ve 15 adet MSCRAMM'nin varlığını ortaya koymuştur. Enterokoklarda şu ana kadar ayrıntılı olarak yedi MSCRAMM tanımlanmıştır: *E.faecalis* için Ace (*E.faecalis*'in kollajen adezini-adhesin of collagen of *E.faecalis*), Fss1, Fss2 ve Fss3 (*E.faecalis* yüzey proteinleri - *E.faecalis* surface proteins); *E.faecium* için Acm (*E.faecium*'un kollajen adezini-adhesin of collagen of *E.faecium*), Scm (*E.faecium*'un ikinci kollajen adezini-second collagen adhesin of *E.faecium*) ve EcbA (*E.faecium*'un kollajen bağlayan protein A'sı-*E.faecium* collagen binding protein A).³

Ace proteini, kromozomal ace geni tarafından kodlanmaktadır. Hücre dışı matriks proteinlerinden daha çok tip I (laminin) ve daha az tip IV (dentin) kollajene bağlanır. Ace, yapısal ve fonksiyonel olarak *S.aureus*'un kollajen bağlayan proteini olan Cna'ya benzer özelliklere sahiptir.^{1,3,5,17,32} Özellikle *E.faecalis* endokarditleri olmak üzere enterokok enfeksiyonlarında ace geni yaygın olarak eksprese edilir. Endokarditli hastaların %90'ında Ace üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Ace'nin, deneysel endokardit patogenezinde de yer aldığı ortaya konmuştur. Dışkı izolatlarına nazaran klinik izolatlarda daha yüksek oranda bulunmaktadır. Ace, ayrıca bakterinin dişteki dentin tabakasına adezyonunda da etkilidir. Rekombinant Ace'ye (rAce) karşı immünize edilmiş veya özgül anti-rAce antikorları verilmiş farelerde, nispeten daha az *E.faecalis* endokarditi geliştiği in vitro çalışmalar ile saptanmıştır. Anti-Ace antikorlarının, hücre dışı matriks proteinlerine Ace'lerin tutunmasını engelledikleri ispatlanmıştır. Fonksiyonel olarak Acm'nin, *E.faecium*'un kollajene bağlanmasında primer derecede sorumlu adezin olduğu belirlenmiştir.^{1,3,5,11,17,32-35}

E.faecium'da ace homologu acm tarafından üretilen Acm, Ace ile kısmen benzer yapı içermektedir.^{1,3,17,32} Klinikte izole edilmiş bir *E.faecium* suşundaki acm geninin ısıya duyarlı vektörler kullanılarak araya giren dizinlerle inaktive edilmesi, bakterinin kollajen I ve IV'e bağlanmasını tamamen ortadan kaldırmıştır.³³ Bu çalışma, klinik açıdan önemli bir *E.faecium* suşunda allelik değiş tokuş yoluyla olası bir virülans geninin inaktive edildiğine dair ilk yayındır.³³ ace

genine benzer şekilde, fonksiyonel acm geninin çoğunlukla klinik izolatlarda bulunması, insersiyon elemanı içeren non-fonksiyonel acm geninin ise esas olarak klinik olmayan izolatlarda saptanması, ilginç bulgudur.^{3,32}

Hem SCM hem de EcbA, tip V kollajene bağlanırlar. EcbA, aynı zamanda fibrinojene de bağlanır. ecbA'nın varlığı, hastanede edinilmiş *E.faecium* izolatlarıyla ilişkilidir. FSS1, FSS2 ve FSS3, farklı fibrinojen moleküllerine bağlanmaktadır; ancak fibrinojene bağlanmaları sürecinde farklı fibrinojen polipeptid zincirlerini nasıl hedef aldıkları bilinmemektedir. Diğer MSCRAMM'ler, klinik ve klinik olmayan izolatlar arasında yaygın olarak bulunurlar.³

Enterococcus faecalis Endokardit Antijen A (EfaA)

İlk olarak endokarditli hastalardan izole edilen *E.faecalis* suşlarında saptanan *E.faecalis* endokardit antijen A (*E.faecalis* endocarditis antigen=EfaA) proteini, efaA geni tarafından kodlanmaktadır. EfaA, serum tarafından indüklenebilen yüzey proteindir. Mangan transport sisteminde reseptör olarak görev görür. Mikroorganizmanın yaşaması ve çoğalması için mangan gereklidir. Mangandan fakir ortamda efaA geni, daha fazla miktarda eksprese edilir. Oral streptokok adezinleri ile enterokok EfaA'sının aminoasit dizisi, %55-60 oranında homoloji göstermektedir. Patojenitedeki rolü, tam olarak anlaşılacakla beraber, enterokokların biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunmada ve biyofilm oluşumunda gerekli olduğu tahmin edilmektedir. EfaA'nın esas olarak endokarditlerde adezin olarak fonksiyon gördüğü ileri sürülmektedir. Ancak hastane ortamından, farklı klinik örneklerden ve çeşitli gıdalardan (süt, peynir, et ve diğerleri) izole edilen *E.faecalis* suşlarında da EfaA'nın bulunduğu gösterilmiştir. EfaA'nın *E.faecalis* ve *E.faecium* türlerinde benzer sıklıkta buldukları saptanmıştır.^{17,36}

Endokardit ve Biyofilm ile İlişkili Piluslar (Ebp)

Piluslar, bakterilerin yüzeyine yerleşmiş olan fibröz protein organelleridir. Pilusların, bazı bakteriler tarafından konak hücrelerine adezyonu sağlamak için kullanıldıkları bilinmektedir. 1981 yılında *E.faecalis*'in yüzeyinde pilus benzeri yapıların bulunduğu saptanmıştır. Pilus oluşumunun, kromozomda bulunan üç genli bir ebpABC lokusu ve bununla ilişkili bir sortaz geni olan srtC genine bağımlı olduğu bilinmektedir.⁵ Pleomorfik yapıda bulunan endokardit ve biyofilm ile ilişkili

pilusların (endocarditis and biofilm-associated pili-Ebp), *E.faecalis*'in konak hücrelerine başlangıç yapışmasında ve biyofilm oluşumunda yer aldıkları kabul edilmektedir. EbpABC, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlardan olan özellikle endokardit, endodonti ve ÜSE'lerin patogeneziye katkıda bulunur.^{3,17,19} *E.faecalis* enfektif endokarditi bulunan hastaların serumlarında EbpABC proteinlerine karşı oluşmuş yüksek düzeyde antikor titrelere saptanmıştır.⁵

Nallapareddy ve ark., 2006 yılında *E.faecalis*'in ebpA-srtC gen kümesinin, biyofilm oluşumunda, başlangıç bağlanmasında ve enfektif endokarditteki rollerini araştırmışlar; ebpA-srtC gen kümesinde oluşan mutasyonların, *E.faecalis* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinde belirgin kayba neden olduklarını göstermişlerdir.³⁷ Ayrıca iki saatlik in vitro bağlanma deneyinde, başlangıç bağlanmasında vahşi ve mutant suşlar arasında önemli farklılıkların olduğu ortaya konmuş; konak hücrelerine, vahşi tip parental (OG1RF suşu) suşların herhangi bir mutant suştan daha yüksek sayıda yapıştıkları saptanmıştır. Son olarak araştırmacılar, karışık enfeksiyonlu bir rat endokardit modelini kullanmışlardır. Çalışmada ratlara, pilusu olmayan EbpA mutanı ve OG1RF'nin eşit sayıdaki bir karışımı enjekte edilmiş; 24 saat sonra vejetasyonlardan elde edilen toplam bakteri miktarındaki EbpA mutanın ortalama yüzdesinin %26,1 ve EbpA mutanın OG1RF'ye göre ortalama virülans indeksinin 0,06 olduğu vurgulanmıştır.³⁷

Feromon Ekspresyonunu Artıran Madde (Eep)

Feromon ekspresyonunu artıran madde (enhanced expression of pheromone-Eep); pCF10 ve pAD1 gibi feromona duyarlı büyük konjugatif plazmidlerin konjugasyonunu artıran ve seks feromonu peptidlerin proteolitik sürecindeki rolü ile tanınan bir membran metalloproteazıdır. Eep ve Ebp piluslarının, enfeksiyonun erken safhalarında önemli olduğu; ancak bu piluslar ile ilgili elde edilen verilerin, Asc10, Ace ve EfbA'nın aksine konak hücrelerine yapışmada kabul edilen herhangi bir ligandı gerektirmedikleri gösterilmiştir. Eep'nin, As proteinlerini kodlayan feromona duyarlı plazmidlerin işlev görmesinde rol aldığı bilinmektedir.^{5,37}

Enterokokkal Fibronektin Bağlayıcı Protein (EfbA)

Enterokokkal fibronektin bağlayıcı protein (enterococcal fibronectin-binding protein A-EfbA), sabit fibronektine yapışmayı sağlayan, *E.faecalis*'in dış yüzeyine lokalize olmuş bir adezindir.⁵ Torelli ve

ark., sinyal dizisi veya LPxTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) aracılı membran bağlayıcısına sahip olmayan, ancak *E.faecalis* yüzeyinde lokalize olan ve EfbA olarak adlandırdıkları fibronektine bağlanan bir adezin tanımlamışlardır.³⁸ Bu proteinin, *S.pneumoniae*'nin aderansı ve virülansı için gerekli yüzey proteini olan PavA ile dizi homolojisi gösterdiği saptanmıştır.³⁸

Biyofilm Oluşumunu Artıran Madde (BEE)

E.faecalis'te, büyük bir konjugatif plazmid üzerinde, bakteriye yüksek düzeyde biyofilm fenotipi özelliği kazandıran yeni bir aktarılabılır gen bölgesi olan bee lokusu keşfedilmiştir.²⁰ Bu gen, enterokoklarda biyofilm oluşumunu artıran madde (biofilm enhancer in enterococci-BEE) oluşumuna neden olmaktadır. Bu çalışma, *E.faecalis*'te biyofilm oluşumu özelliği kazandıran aktarılabılır bir elemana ilişkin ilk yayın olması bakımından önemlidir.²⁰ bee lokusu, *E.faecalis* izolatlarının sadece %5'inde saptanmış iken ebp (endokardit ve biyofilm ile ilişkili pilus) operonu, neredeyse tüm *E.faecalis* izolatlarında tespit edilmiştir.³

Jelatinaz (Proteaz) (Gel)

Saptanmasında jelatin kullanılması nedeniyle Gel denen enterokokal proteaz, hücre dışı bir çinko-endopeptidaz olup hücre dışı çinko içeren matriks metalloproteaz ailesinin bir üyesidir. Enterokok suşlarının proteaz aktivitesi, %3 jelatin veya %1,5 süt tozu katılmış yarı-katı besiyerlerinde saptanabilmektedir.^{4,5,39} Gel; kollajen, fibrinojen, fibrin, jelatin, kazein, insülin, hemogloblin, seks feromonları ile ilişkili peptidler ve diğer bazı biyoaktif küçük peptidleri, C3 ve C3a kompleman bileşenlerinin yaptığı gibi hidrolize edebilmektedir. Gel, konak dokusunu yıkıma uğratarak bakteriye besin sağlar. Gel üreten *E.faecalis* suşlarının akut toksik etkilerinin daha fazla olduğu ve Gel enziminin hayvan modellerinde endoftalmit ve endokardit tablosunu şiddetlendirdiği saptanmıştır. Gel üretimi inhibisyonunun doku kültüründe kemik rezorbsiyonunu azalttığı gösterilmiştir.^{1,4,9,10,17,39} Ayrıca epitelial hücreler, inflamatuvar hücreler, osteoklast ve fibroblast gibi memeli hücreleri tarafından da üretilen Gel, hücre dışı matriksi degrade etmektedir.¹⁷

E.faecalis'in iyi incelenmiş virülans faktörü olan Gel enzimi, dört fsr geninin (fsrA, fsrB, fsrD ve fsrC) birleşiminin oluşturduğu iki bileşenli fsr sistemi tarafından üretimi kontrol edilen salgısal bir bakteri proteazıdır. Epidemiyolojik veriler, virülansda Gel ve fsr lokusunun ilişkisini ve *E.faecalis*'in virülansında

fsr sisteminin önemli rol oynadığını göstermektedir. fsr lokusunun mikrodizi sonuçları, potansiyel olarak virülans ve metabolik yollarda etkili diğer genlerin ekspresyonunu aktive ettiğini göstermiştir.^{3,6} Gel negatif suşlara gel geni klonlandığında Gel üretme özelliğinin kazandırıldığı anlaşılmıştır.^{3,9} fsr operonunda oluşan mutasyonlar ve fsr kontrollü gen olan gel'in inaktivasyonu, Gel'in *E.faecalis*'in biyofilm oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu ve fsr sisteminin, Gel üretimiyle biyofilm oluşumunu kontrol ettiğini göstermiştir.^{3,10} Biyofilm oluşumundaki rollerinin yanısıra Gel ve fsr sistemi; fare peritoniti, *Caenorhabditis elegans* enfeksiyonu ve tavşan endoftalmi gibi farklı hayvan enfeksiyon modellerinde virülans ile ilişkilendirilmiştir.³ Gel pozitif *E.faecalis* suşu germ-free ratlarda dış çürüklerine yol açarken Gel negatif suşlarda bu etki belirlenememiştir.⁴

Sitolizin (Hemolizin) (Cyl)

Protein yapısındaki Cyl, cyl operonunda bulunan ve cylA, cylB, cylI, cylLL, cylLS, cylM, cylR₁ ve cylR₂ olarak adlandırılan sekiz gen tarafından kodlanmaktadır. cyl genleri, genellikle büyük bir feromona duyarlı plazmid üzerinde taşınır; ancak bakteriyel kromozoma entegre olmuş patojenite adacığında da bulunabilirler.^{12,40,41} Feromona duyarlı pAD1 plazmidi, Cyl'yi kodlayan ve detaylı araştırılmış ilk plazmidir.^{4,5} cyl operonu, cyl dışında ayrıca asal ve esp gibi diğer virülans genleri ile de ilişkilidir.^{9,11,17,41} Streptococcus pyogenes tarafından üretilen streptolizin S, yapısal ve fonksiyonel olarak Cyl'ye benzemektedir.^{12,16}

Cyl; bağışıklık hücreleri yanısıra insan, at, tavşan ve inek eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren bir sitotoksin ve aynı zamanda birçok gram pozitif bakteriye karşı bakterisidal etki gösteren bir bakteriyosindir. Cyl'nin, makrofaj ve PMNL'ler dışında retina ve bağırsak hücreleri için de litik aktivitesi söz konusudur. Dolayısıyla, hem ökaryotik hem de prokaryotik hücrelerde litik aktiviteye neden olur. Buna karşılık, gram negatif bakterilere ve koyun eritrositlerine karşı inaktif olduğu gösterilmiştir.^{4,9,10,12,16}

E.faecalis tarafından Cyl üretimi, belli kanlı agar besiyerlerinin yüzeyinde oluşan kolonilerin etrafında şeffaflığın oluşumuyla tanınmaktadır. Bununla birlikte klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *E.faecalis* fenotipi, sıklıkla gözden kaçırılmaktadır; çünkü kanlı agar plaklarında yaygın olarak kullanılan hedef hücreler olan koyun eritrositleri, Cyl aracılı lizise dirençlidir. Tavşan, insan, at ve ineklerden

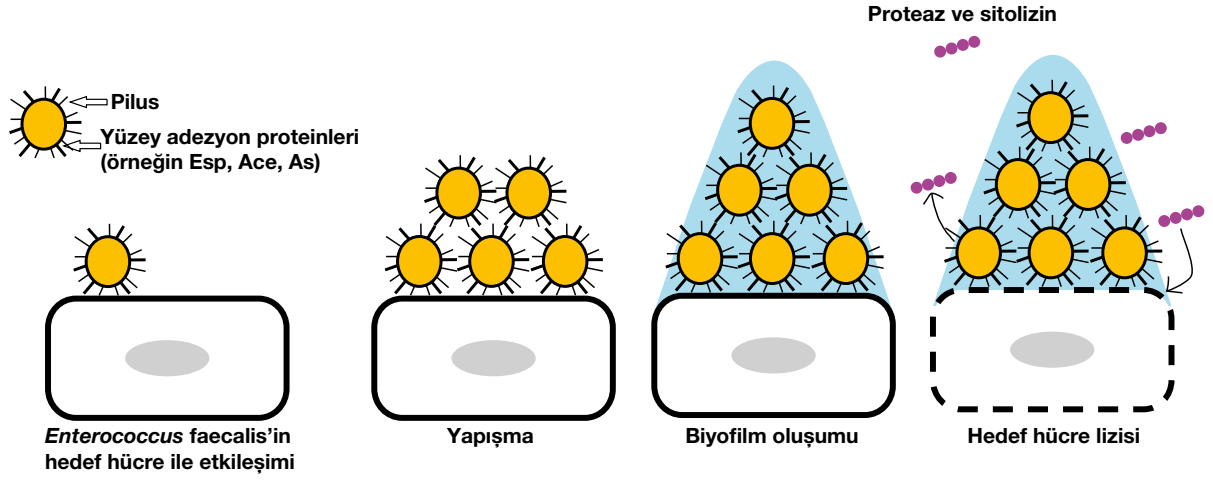
elde edilen eritrositler, *E.faecalis* Cyl'si tarafından kolayca eritilir ve bu yüzden *E.faecalis* fenotipini tanımlamak için bu eritrositler kullanılmalıdır. Daha genel bir terim olan Cyl terimi, Cyl'nin ökaryotik ve prokaryotik hücreleri içerecek şekilde hedef hücre aralığının geniş olması bakımından, tarihsel terim olan hemolizin yerine günümüzde daha çok tercih edilmektedir.⁴

Enterokokların virülansına etkileri konusunda yapılmış birçok çalışmada, Cyl toksininin, deneysel modellerde enfeksiyonu şiddetlendirdiği gösterilmiştir.¹⁰ Japonya'da Ike ve ark., *E.faecalis* izolatlarında Cyl üretimini, enfeksiyon ile ilişkili klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının %60'ında saptamışlar iken sağlıklı bireylerin dışkı örneklerinde izole edilen suşların ancak %17'sinde tespit etmişlerdir.⁴² Farklı bir çalışmada, bakteriyemili hastalardan izole edilen suşlardaki Cyl üretiminin, endokarditli hastalardan ve sağlıklı bireylerin dışkılarından izole edilen suşlardakine göre daha fazla olduğu saptanmıştır.²⁷ Aksi yönde bir çalışmada ise bakteriyemi, endokardit ve sağlıklı bireylerin dışkı izolatlarında Cyl üretim sıklığı bakımından bir farklılık tespit edilememiştir.²⁶

Hyalüronidaz (Hyl)

Streptokok ve stafilokok gibi bazı gram pozitif bakterilerin yanısıra enterokoklar da kromozomal hyl geni tarafından kodlanan Hyl enzimini üretebilmektedir. Hyl, hyalüronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan bir enzimdir. Bağ dokusundaki mukopolisakkaritleri depolimerize ederek hem bakterinin hem de toksinlerinin konak dokularında yayılmalarına neden olur. Bununla beraber hyalüronik asidin parçalanması sonucu oluşan disakkaritler de bakteriler için besin kaynağı olabilir. Hyl enzimi, aynı zamanda diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini kolaylaştırarak doku hasarının şiddetini artırır. Hyl enzimi, dişlerin kök kanalından periapikal lezyonlara enterokokların geçişini kolaylaştırarak dış çürüklerindeki doku hasarında rol oynamaktadır.^{9,17} Özellikle *E.faecium* tarafından sentezlenen Hyl'nin, halen ÜSE patogeneziindeki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.⁹

Enterokoklar, konak hücreleri ile pilusları aracılığıyla etkileşime girerler. As, Esp ve Ace gibi enterokokların yüzey proteinleri, bakterilerin konak hücrelerine sıkıca yapışmasını sağlar. Enterokokların kümeleşmesi, biyofilm oluşumunu ve ekzopolisakkarit matriksin hazırlanmasını indükler. Bakterilerin salgıladığı proteaz ve sitolizin, konak hücre ölümüne ve enfeksiyonun yayılmasına aracılık etmektedir (Şekil).



Şekil. *E. faecalis*'in pilusları aracılığıyla konak hücresi ile etkileşimi, yüzey adezyon proteinleri ile konak hücresine yapışması, biyofilm oluşumu ve salgıladığı proteaz ve sitolizinin etkisi ile konak hücresinin lizisinin şematik olarak gösterilmesi

Virülans Genlerinin Ekspresyonu

Enterokokların virülans genlerinin ekspresyonu, üreme ortamlarındaki maddelerin niteliğine ve miktarına bağlı olarak etkilenebilir. van Wamel ve ark., *E. faecium*'da Esp sentezinin değişken olduğunu göstermişlerdir.³⁰ esp geni pozitif *E. faecium* suşlarından bazıları, Esp ve biyofilmi neredeyse hiç oluşturmaz iken diğerleri, oldukça fazla Esp sentezine ve biyofilm yapımına neden olmaktadır. *E. faecium*'da Esp sentezi, üreme koşulları ile doğrudan ilişkilidir; 37°C'de üreme, 21°C'de üremedekine göre ve anaerob koşullarda üreme, aerob koşullarda üremeye göre bu genin sentezini artırmaktadır.³⁰ Virülans genlerinin, üreme koşullarına ve üreme evresine bağımlı sunumu *E. faecalis* türünde de gösterilmiştir.³⁴ Örneğin *E. faecalis* ace geninin transkripsiyonu, bakterinin kollajen tip I ve tip IV'ün bulunduğu ortamda üremesi durumunda artar.³⁴ Bazı adezin genlerinin tüm suşlarda ve tüm üreme koşullarında mevcut olduğu, ancak bunlardan bazılarının suşların ancak insan serumunda üretilmesinden sonra eksprese edildiği anlaşılmıştır.⁴ *E. faecalis*'in mangandan fakir ortamda üretilmesi, efaA geninin ekspresyonunu etkiler.¹⁷ Bu etkileri kontrol eden düzenleyici yolların tam olarak ne olduğu bilinmemektedir; ancak fsr gen lokusunun rol oynaması olasıdır. fsr gen bölgesinin, Gel ve proteaz sentezini kontrol altında tuttuğu zaten bilinmektedir; hatta yakın zamanda bu gen bölgesinin, pek çok genin sentezini kontrol altında tutan genel bir düzenleyici olduğu ortaya çıkmıştır.⁴³ Bunun yanısıra, çevresel strese verilen yanıtta rol oynayıcı düzenleyici genler olan croRS veya prfA benzeri genler de, üreme koşullarına göre virülans genlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahip olabilirler.^{44,45} Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, klinik *E. faecalis* izolatlarında sessiz cyl geninin fenotipik profile yansımadağı (kanlı agar plaklarında hemolitik aktivite izlenemediği), ancak enfeksiyon bölgesindeki çevresel faktörlerin bu geni aktive edebildiği gösterilmiştir.³⁶

Enterokokların virülansını belirleyen Esp'nin, abiyotik yüzeylere tutunma ve biyofilm yapımında görev almasının yanısıra konjugasyon sıklığındaki artıştan da sorumlu olduğu gösterilmiştir.⁴⁶ Bu durum Esp'nin, hücreler arasındaki etkileşimde ya doğrudan bir rol oynadığını ya da yeni genetik elemanlar edinme potansiyeli artmış suşlar için bir görev görebileceğini düşündürmektedir. Sadece direnç genleri değil, virülans genleri de horizontal gen transferi yoluyla aktarılabilir. Son yıllarda, *E. faecalis*'te esp geninin bulunduğu patojenite adacığının horizontal transferi üzerinde durulmuştur.⁴⁷⁻⁴⁹ *E. faecalis* patojenite adacığının, cyl gen kümesini ve esp genini de içerecek şekilde yaklaşık 27 kbp büyüklüğündeki internal parçasının, fare GIS'indeki geçici kolonizasyonu sırasında yüksek sıklıkta aktarılabilirdiği gösterilmiştir.⁴⁷ Horizontal gen transferi nedeniyle bu patojenite adacığı, *E. faecalis*'te tek klonal kompleks ile sınırlı değildir; insan ve hayvanlardaki farklı genetik serilere ait enterokoklarda da bulunmaktadır.^{48,49}

SONUÇ

En kesin tanımıyla "virülans faktörleri", konakta hastalığa neden olmak için gerekli olan ancak hayatta kalmak için gerekli olmayan maddeler olarak tanımlanırlar.⁶ Enterokokların antibiyotik direnci ile ilgili bugüne kadar çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen virülans faktörleri konusunda yapılan çalışmalar son derece azdır.^{3,4,9} Son zamanlarda *E. faecalis*'in ve daha az olarak *E. faecium*'un virülansı konusunda yapılan kısıtlı çalışmalar da daha çok adezyon/biyofilm oluşumu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır.¹⁹ Günümüzde bu genlerin klinikle ilişkileri konusunda pek çok şey bilinmemekte ve virülans faktörleri ile patojenite mekanizmaları arasındaki ilişki halen aydınlatılmayı beklemektedir.⁹

E.faecalis ve *E.faecium*'da ortaya konmuş farklı yüzey yapıları, enterokok enfeksiyonlarına karşı alternatif tedavi ve önleme stratejilerinin geliştirilmesinde umut verici adaylar olabilir. Onlardan sadece birkaçı, uygun hayvan modellerinde test edilmiştir. Hücre duvarı karbonhidrat antijenleri (LTA ve kapsüler polisakaritler gibi) ve birçok MSCRAMM'nin, koruyucu antikorların hedefleri oldukları gösterilmiştir. Aynı zamanda birkaç ek protein antijen, şimdiye kadar uygun korunma çalışmaları yayınlanmamış olsa da koruyucu bağışıklık yanıtının hedefi olabilir. Özgül virülans faktörlerinin ekspresyonu ile müdahale, yeni tedaviler için kullanılabilir; ancak bugüne kadar klinik olarak test edilmiş böyle bir tedavi yaklaşımı örneği yoktur. Bu yeni saptanan maddeler, sonuçta enterokoklara karşı gittikçe direnç gelişen ve kullanılmaz hale gelen antibiyotiklerin yerine geçebilir.³

Özellikle hastanelerde ÇİD enterokok enfeksiyonlarındaki artış, enterokok enfeksiyonlarının oluşmasında veya hastaların klinik tablolarının ağırlaşmasında etkili olan mekanizmaların dikkatlice araştırılmasını gerektirmektedir. Enterokok türlerinin nozokomiyal patojen olarak artan önemi ve özellikle glikopeptidler

olmak üzere antibiyotiklere direncin artan sıklığı göz önüne alındığında, enterokokların invazifliği ve hastalığın şiddeti ile ilişkili virülans faktörlerinin tanımlanması ve bu virülans faktörlerinin antibiyotiklerle ilişkilerinin ortaya konması, gelecek araştırmaların önemli konusu olacaktır.⁹ Enterokok enfeksiyonlarının patogenezi etkileyen virülans faktörlerinin ve bu patojenlere karşı oluşan konak bağışıklık yanıtının iyi anlaşılması, etkenin nozokomiyal yayılımının ve enfeksiyonlarının önlenmesine yönelik yeni tedavi ve önleme yaklaşımlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Enterokokların, enfeksiyonlarda olduğu gibi, insan mikrobiyotasına nasıl katkıda bulunduğu anlaşılması, kommensallik ile patojenite arasında evrilen süreçte tam olarak nerede olduklarını anlamamıza yardımcı olacaktır.⁶ Enterokokların insan mikrobiyotası içerisinde kommensal olarak varlığının ve non-enfeksiyöz davranışının desteklenmesi, enterokok enfeksiyonlarının etkin şekilde önlenmesi ve tedavisi için yeni bir strateji olarak görülebilir.

*Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.



C	İLETİŞİM İÇİN: Orhan Baylan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34668, Üsküdar, İstanbul orhan.baylan@sbu.edu.tr, drobaylan@gmail.com
ORCID	OB https://orcid.org/0000-0002-6529-7824
✓	GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 05 / 02 / 2018 • KABUL TARİHİ: 10 / 08 / 2018

KAYNAKLAR

1. Giridhara-Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umopathy BL. Review of virulence factors of Enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. Indian J Med Microbiol 2009; 27: 301-305.
2. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections and antimicrobial resistance. Indian J Med Res 2008; 128: 111-121.
3. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 533-540.
4. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 462-478.
5. Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M. Virulence factors associated with Enterococcus faecalis infective endocarditis: a mini review. Open Microbiol J 2017; 11: 1-11.
6. Garsin DA, Frank KL, Sillanpaa J, et al. Pathogenesis and models of enterococcal infection. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. (eds.) Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston 2014: 185-257.
7. Durmaz G. Enterokoklar. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (eds.) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2008: 2057-2064.
8. Moellering RCJ. Principle of anti-infective therapy: Enterococcus species, Streptococcus bovis, and Leuconostoc species. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. (eds.) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia 2005: 1826-1835.

9. Baylan O, Nazik H, Bektore B, et al. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary Enterococcus isolates. Mikrobiyol Bul 2011; 45: 430-445.
10. Mete E, Kaleli İ, Cevahir N, et al. Enterokok türlerinin virülans faktörlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2017; 51: 101-114.
11. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 2622-2636.
12. Leavis H, Top J, Shankar N, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity. J Bacteriol 2004; 186: 672-682.
13. Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, et al. Enterococcus faecalis aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 26: 49-60.
14. Wells CL, Moore EA, Hoag JA, et al. Inducible expression of Enterococcus faecalis aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. Infect Immun 2000; 68: 7190-7194.
15. Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, et al. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of Enterococcus faecium endocarditis. Microbes Infect 2011; 13: 1185-1190.
16. Cox CR, Coburn PS, Gilmore MS. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. Curr Protein Pept Sci 2005; 6: 77-84.
17. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15: 308-320.

18. Guzman CA, Pruzzo C, LiPira G, Calegari L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun* 1989; 57: 1834-1838.
19. Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemics. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 384-390.
20. 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: 2063-2072.
21. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2004; 186: 154-163.
22. Kozlowicz BK, Dworkin M, Dunny GM. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 141-147.
23. Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, et al. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun* 1998; 66: 218-223.
24. Johnson JR, Clabots C, Hirt H, Waters C, Dunny G. Enterococcal aggregation substance and binding substance are not major contributors to urinary tract colonization by *Enterococcus faecalis* in a mouse model of ascending unobstructed urinary tract infection. *Infect Immun* 2004; 72: 2445-2448.
25. Chow JW, Thal LA, Perri MB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2474-2477.
26. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* 1995; 171: 1223-1229.
27. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 1995; 34: 152-156.
28. Guzman CA, Pruzzo C, Plate M, Guardati MC, Calegari L. Serum dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesins involved in the colonization of heart cells. *Microb Pathog* 1991; 11: 399-409.
29. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193-200.
30. van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, et al. Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 2007; 75: 924-931.
31. Raad II, Hanna HA, Boktour M, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, *esp* gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 5046-5050.
32. Sillanpaa J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 896-901.
33. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 334-335.
34. Nallapareddy SR, Murray BE. Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis ace* transcription, a mechanism for modulating host-E.*faecalis* interaction. *Infect Immun* 2006; 74: 4982-4989.
35. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 2003; 47: 1733-1747.
36. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-1635.
37. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* 2006; 116: 2799-2807.
38. Torelli R, Serror P, Bugli F, et al. The PavA-like fibronectin-binding protein of *Enterococcus faecalis*, EfbA, is important for virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *J Infect Dis* 2012; 206: 952-960.
39. 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: 2579-2586.
40. Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002; 415: 84-87.
41. Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* 2004; 293: 609-618.
42. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1524-1528.
43. Bourgogne A, Hilsenbeck SG, Dunny GM, Murray BE. Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *Fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J Bacteriol* 2006; 188: 2875-2884.
44. Muller C, Le Breton Y, Morin T, et al. The response regulator *CroR* modulates expression of the secreted stress-induced *SalB* protein in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2006; 188: 2636-2645.
45. Giard JC, Riboulet E, Verneuil N, et al. Characterization of *Ers*, a PrfA-like regulator of *Enterococcus faecalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 46: 410-418.
46. Lund B, Billström H, Edlund C. Increased conjugation frequencies in clinical *Enterococcus faecium* strains harbouring the enterococcal surface protein gene *esp*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 588-591.
47. Coburn PS, Baghdayan AS, Dolan GT, Shankar N. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol* 2007; 63: 530-544.
48. Shankar N, Baghdayan AS, Willems R, Hammerum AM, Jensen LB. Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pigs in Denmark. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4200-4203.
49. Nallapareddy SR, Wenxiang H, Weinstock GM, Murray BE. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol* 2005; 187: 5709-5718.