

**T.C.**  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOKLARIN VİRULANS  
FAKTÖRLERİNİN YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİD DİRENCİYLE  
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**DR. HANDAN GENEZ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**2021**

**T.C.**  
**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKOKLARIN VİRULANS  
FAKTÖRLERİNİN YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİD DİRENCİYLE  
İLİŞKİLENDİRİLMESİ**

**DR. HANDAN GENEZ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. Fatma BUDAK**

**ETİK KURUL ONAYI TARİHİ VE SIRA SAYISI: 04/03/2021-2021/61**

**2021**

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	V
Kısaltmalar Dizelgesi.....	VI
Çizelgeler Dizelgesi .....	IX
Çizimler Dizelgesi.....	XI
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Enterokokların tarihçesi.....	3
2.2. Enterokokların genel özellikleri.....	3
2.3. Enterokokların sınıflandırılması .....	4
2.4. Epidemiyoloji ve klinik önemi.....	7
2.5. Enterokok türlerine bağlı oluşan enfeksiyonlar .....	8
2.5.1. Üriner sistem enfeksiyonları .....	8
2.5.2. Enfektif endokardit.....	8
2.5.3. Bakteriyemi.....	9
2.5.4. Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar .....	9
2.5.5. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	9
2.5.6. Menenjit .....	9
2.5.7. Diğer enfeksiyonlar .....	10
2.6. Virülans ve patogenez .....	10
2.6.1. Adezyon .....	10
2.6.2. Enterokokların virülans faktörleri .....	10
2.6.2.1. Agregasyon maddesi .....	11
2.6.2.2. Ekstrasellüler Yüzey Proteini .....	12
2.6.2.3. <i>Enterococcus faecalis</i> Antijen A Proteini (EfaA Proteini).....	12

2.6.2.4. Hemolizin/Sitolizin .....	12
2.6.2.5. Jelatinaz .....	13
2.6.2.6. Hiyaluronidaz .....	14
2.6.2.7. Enterokokların adeziv matris moleküllerini tanıyan kollajen bağlayıcı mikrobiyal yüzey bileşenleri (MSCRAMM) .....	14
2.6.2.8. Lipoteikoik asit (LTA) .....	15
2.6.3. Biyofilm .....	15
2.7. Antibiyotik direnç mekanizmaları .....	17
2.7.1. $\beta$ -laktam direnci .....	20
2.7.2. Aminoglikozid direnci .....	20
2.7.3. Glikopeptid direnci .....	22
2.7.4. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin (MLS) direnci .....	23
2.7.5. Kinolon direnci .....	24
2.7.6. Oksazolidinon direnci .....	24
2.7.7. Kloramfenikol direnci .....	24
2.7.8. Tetrasiklin direnci .....	25
2.7.9. Tigesiklin direnci .....	25
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1. Çalışmaya alınan izolatlar .....	26
3.2. Tampon çözeltilerin hazırlanması .....	26
3.2.1. Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) .....	26
3.2.2. Tris (pH: 8.0) .....	26
3.2.3. Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) .....	26
3.2.4. Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) .....	27
3.2.5. %1 Kristal Viyole Çözeltisi .....	27
3.2.6. Steril fosfat tamponu .....	27
3.2.7. 0,5 McFarland standardı .....	27
3.2.8. %96'lık Etanol hazırlanışı .....	27
3.2.9. EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (Bio Basic, Canada) içeriği hazırlanışı .....	27
3.2.10. 100 $\mu$ M'lık stok primer sulandırımı .....	28

3.3. Besiyelerinin hazırlanması.....	28
3.3.1. Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri .....	28
3.3.2. Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri .....	28
3.3.3. Katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyeri (KA-MHB) .....	28
3.3.4. Nutrient Gelatin .....	28
3.4. Hemolizin üretiminin incelenmesi.....	29
3.5. Jelatinaz aktivitesinin incelenmesi .....	29
3.6. Biyofilm aktivitesinin incelenmesi .....	29
3.7. Antibiyotik duyarlılık testleri .....	30
3.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) .....	32
3.8.1. Deoksiribonükleik Asit izolasyonu .....	32
3.8.2. Patogenezden sorumlu virülans genlerinin PZR yöntemi ile belirlenmesi .....	33
3.8.3. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerinin PZR yöntemi ile belirlenmesi .....	35
3.9. Etik kurul onayı.....	39
3.10. Proje desteği:.....	39
3.11. İstatistik .....	39
3.12. Referans suşlar .....	39
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>40</b>
4.1. İzolatların genel özellikleri.....	40
4.2. İzolatların hemolizin üretimi .....	43
4.3. İzolatların jelatinaz aktivitesi .....	44
4.4. İzolatların biyofilm üretimi .....	44
4.5. Antibiyotik duyarlılık sonuçları .....	46
4.6. PZR ile tespit edilen virülans genleri ve sıklığı .....	48
4.7. PZR ile tespit edilen yüksek düzey aminoglikozid direnç genleri ve sıklığı .....	53
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>54</b>

<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>68</b>
<b>7. ÖZET .....</b>	<b>71</b>
<b>8. ABSTRACT .....</b>	<b>73</b>
<b>9. EKLER .....</b>	<b>75</b>
<b>10. KAYNAKLAR.....</b>	<b>76</b>



## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince deneyimleriyle bana yol gösteren, tezimin planlanması ve yürütülmesinde ilgi, hoşgörü ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma BUDAK'a,

Uzmanlık Eğitimimin başından itibaren hiçbir konuda desteğini esirgemeyen bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, saygıdeğer hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya,

Eğitimimde karşılaştığım her zorlukta desteklerini esirgemeyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Sema KEÇELİ, Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Prof. Dr. Murat HÖKELEK ve Dr. Öğr. Üyesi Erdener BALIKÇI'ya,

Tez projemdeki desteği için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

İstatistiksel analizlerin yapılması esnasında desteklerinden dolayı Prof. Dr. Canan BAYDEMİR'e

Hem destekleriyle hem de dostluklarıyla yanımda olan sevgili çalışma arkadaşlarım, Arş. Gör. Dr. Doğanhan Kadir ER, Arş. Gör. Eda YAZICI ÖZÇELİK, Uzm.Dr. Melike DEMİR, Uzm. Dr. Elif OKUMUŞ, Arş. Gör. Dr. Merve YILDIZ, Arş. Gör. Dr. Yılmaz PULCU, Arş. Gör. Dr. Ayşenur KOÇAK, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin UZUNER, Uzm. Dr. Melike KURT, yüksek lisans öğrencilerimiz Özlem Aleyna ÜN ve Berat ÖZKAN ile laboratuvarlarımızda özveriyle çalışan tüm teknisyen arkadaşlarıma,

Bu süreçte her zaman bana destek olan, gecesini gündüzüne katarak beni yetiştiren, sevgilerini ve özverilerini hiçbir zaman esirgemeyen, annem Gülseren TOÇOĞLU ve babam İslam TOÇOĞLU'na,

Sonsuz özveri, sevgi ve desteğini her daim hissettiren hayat arkadaşım Uzm. Dr. Samet GENEZ'e ve yer yer zamanından çaldığım, neşe kaynağım canım kızım Defne GENEZ'e çok teşekkür ederim.

Dr. Handan GENEZ

## Kısaltmalar Dizelgesi

AAC	: Asetiltransferaz
AME	: Aminoglikozid Deęiřtirici Enzim
AMP	: Ampisilin
ANT	: Adeniltransferaz
APH	: Fosfotransferaz
ARA	: Arabinoz
ARG	: Arjinin
AS	: Agregasyon Maddesi
bç	: Baz çifti
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
°C	: Santigrat
CAESAR	: Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CDC	: Centers for disease Control an Prevention
DltA	: D-alanine-D-alanil Taşıyıcı Protein Ligaz
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EARSS	: European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EcbA	: E. faecium Kolajen Bağlayıcı Protein A
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EfaA Proteini	: <i>Enterococcus faecalis</i> Antijen A Proteini
EH	: Eskulin Hidrolizi
EPA	: Enterokokkal Polisakkarit Antijen
EPS	: Hücre Dışı Polisakkarit
ESCMID	: European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESP	: Enterokok Yüzey Proteini
EUCAST	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GPI	: Gram-Positive İdentifikasyon
HCl	: Hidroklorik Asit



HT	: Hipertansiyon
HYL	: Hyaluronidaz
KA-MHB	: Mueller Hinton Broth
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LAP	: Leucine $\beta$ -naphthylamide
LAPase	: Leucine Aminopeptidase
LNZ	: Linezolid
LPSN	: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
LTA	: Lipoteikoik Asit
MALDI TOF-MS	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
MAN	: Mannitol
MGP	: Metil- $\alpha$ -D-glikopiranozid
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	: Mililitre
MLS	: Makrolid-Linkozamid-Streptogramin
mm	: Milimetre
MSCRAMM	: Enterokokların Adeziv Matris Moleküllerini Tanıyan Kollajen Bağlayıcı Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
OD	: Optik Dansite
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
PYR	: L-pyrolidonyl- $\beta$ -naphthylamid
PYU	: Pirüvat
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAF	: Rafinoz
SAL	: Secretory Antigen Like
SİP	: Siprofloksasin

SOR	: Sorbitol
SrtC	: sortazC
SVO	: Serebrovasküler Hastalık
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEİ	: Teikoplanin
TEL	: Tellürit
TG	: Tigesiklin
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
UAMDSS	: Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi
VAN	: Vankomisin
VRE	: Vankomisin dirençli enterokok
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
YDAD	: Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
$\mu\text{m}$	: Mikrometre

## Çizelgeler Dizelgesi

1. Çizelge. Gram pozitif, katalaz negatif kokların fenotipik ve biyokimyasal özellikleri .....	6
2. Çizelge. Enterokok türlerin biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması .....	6
3. Çizelge. Enterokokların doğal ve kazanılmış direnç gösterdiği antibiyotikler .....	19
4. Çizelge. Enterococcus spp antibiyotik MİK sınır değerleri .....	31
5. Çizelge. Virülans genlerine ait primer dizileri ve moleküler ağırlıkları .....	34
6. Çizelge. Virülans genlerini tespit için PZR reaksiyon karışımı .....	34
7. Çizelge. Virülans genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları .....	35
8. Çizelge. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerine ait primer dizileri ve moleküler ağırlıkları .....	36
9. Çizelge. <i>Aac(6')-Ie-aph(2'')-1a</i> ve <i>Aph(2'')-1d</i> genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı .....	36
10. Çizelge. <i>Aph(2'')-1b</i> ve <i>Aph(2'')-1c</i> genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı .....	37
11. Çizelge. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerinin tespitinde kullanılan PZR koşulları .....	38
12. Çizelge. İzolatların örnek türü ve kliniklere göre dağılımı .....	42
13. Çizelge. Enterokok türlerinin kliniklere göre dağılımı .....	43
14. Çizelge. Enterokok izolatlarında hemolizin üretimi, jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretiminin dağılımı .....	45
15. Çizelge. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları .....	46
16. Çizelge. <i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması .....	47
17. Çizelge. Uzun süreli antibiyotik kullanımında antimikrobiyal direnç dağılımı .....	47
18. Çizelge. İzolatların antimikrobiyal duyarlılığının hemolizin üretimi, jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretimi ile ilişkilendirilmesi .....	48
19. Çizelge. Enterokok izolatlarında virülans gen bölgelerinin sıklığı .....	50
20. Çizelge. Enterokok türlerinde virülans genleri varlığının hastaların yaşlarına göre dağılımı .....	50
21. Çizelge. Ayaktan hasta ile yatan hastalardan izole edilen enterokok türlerinin virülans gen varlığı yönünden karşılaştırılması .....	51

22. Çizelge. Biyofilm ve hemolizin üretme özellikleri ile <i>asaI</i> , <i>esp</i> ve <i>gelE</i> virülans gen bölgeleri varlığının ilişkisi.....	51
23. Çizelge. Enterokok izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığının virülans gen bölgeleriyle ilişkisi.....	52



## Çizimler Dizelgesi

1. Çizim. Enterokok cinsinin 16S rRNA dizi analizi özelliklerine göre hazırlanan filogenetik dendrogram.....	5
2. Çizim. Nozokomiyal enterokok yayılımının önemli yolları .....	8
3. Çizim. Enterokoklara ait virülans faktörleri.....	11
4. Çizim. Biyofilm gelişim aşamaları .....	16
5. Çizim. Hastaların yaş ve cinsiyetlere göre dağılımı .....	40
6. Çizim. İzolatların kliniklere göre dağılımı .....	41
7. Çizim. Hemolizin üretiminin değerlendirilmesi .....	43
8. Çizim. Jelatinaz aktivitesinin değerlendirilmesi .....	44
9. Çizim. Biyofilm aktivitesi açısından kristal viyole ile boyanması sonrası mikroplak görünümü .....	45
10. Çizim. PZR ve elektroforez sonrası izolatlarda saptanan virülans genlerine ait jel görüntüleri.....	49
11. Çizim. PZR ve elektroforez sonrası izolatlarda saptanan <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> direnç genine ait jel görüntüsü.....	53

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enterokoklar önceleri virülansı düşük bakteriler olarak ele alınırken hastanelerde canlı kalmaları ve yayılmaları açısından önemli olan klor, gluteraldehit, alkol gibi kimyasal dezenfektanlara dayanabilme özellikleri, cansız yüzeylerde uzun süre hayatta kalabilmeleri, gerek doğal gerekse kazanılmış antibiyotik dirençleri, hastalarda endokardit, bakteriyemi, üriner sistem ve katater ilişkili enfeksiyonlar gibi enfeksiyonlara sebep olmaları, enterokokların yıllar içerisinde klinik önem kazanmasına ve günümüzde nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer almasına neden olmuştur.<sup>1,2</sup>

Enterokok türleri nozokomiyal bakteriyemilerin en yaygın üçüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarının ikinci sıklıkta saptanan etkenleri olarak gösterilmektedir.<sup>3,4</sup>

Enterokoklar bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri (LAB) grubuna dahil mikroorganizmalardır. Oval şekilde tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde görülebilen, gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob bakterilerdir. 5-65 °C sıcaklık aralığında, 4,5-10 pH aralığında ve yüksek sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonlarının bulunduğu zor çevre şartlarında canlı kalabilmektedir.<sup>5,6,7</sup> Günümüze kadar yapılan çalışmalarda en az 70 adet enterokok türü belirlenmesine rağmen *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (%85-90) ve *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) (%5-10) klinik örneklerden en fazla izole edilen türlerdir.<sup>8</sup>

Virülans faktörleri konakta kolonize olma, yayılma ve kalıcı olmak için patojenin sahip olduğu biyomoleküler yapılarıdır. Enterokokların virülansından tek bir faktör sorumlu değildir. Agregasyon maddesi (AS), enterokok yüzey proteini (esp), hemolizin / sitolizin, jelatinaz ve biyofilm oluşumu enterokoklarda virülansın sorumlu önemli faktörler arasındadır.<sup>9,10</sup> *asaI* geni tarafından üretilen agregasyon maddesinin ana işlevi konak hücreye yapışmayı sağlamaktır.<sup>1</sup> Enterokokların nötrofil, endokard ve böbrek epitel hücreleri gibi çeşitli ökaryot hücre yüzeylerine adezyonunu artırmaktadır.<sup>11</sup> Esp, konakta immun sisteminin baskılanması, kolonizasyon, biyofilm oluşumu ve antibiyotik direncinde rol oynayan önemli bir yüzey proteindir.<sup>12</sup> Jelatinaz ise jelatin, kollajen, fibrinojen, kazein, hemoglobin, insülin ve bazı biyoaktif peptitleri hidrolize edebilen ve bununla birlikte biyofilm oluşumu sürecine katkıda bulunan bir bakteri proteazıdır. Biyofilmler, mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere tutunarak, kendi ürettikleri polimerik madde içerisinde korunaklı bir şekilde kalabilmesini sağlamaktadır. Nozokomiyal

enfeksiyonların %65'inden fazlasının etken organizmanın biyofilm üretme kabiliyetinden kaynaklandığı ve biyofilm oluşturan mikroorganizmaların antimikrobiyal dirençlerinin de yüksek olduğu birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir.<sup>13,14,15</sup> Nozokomiyal enterokok izolatlarında artan çoklu ilaç direnci, özellikle virülans faktörleri olmak üzere enterokokların daha fazla araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Antibiyotik direnci ise patojen bakterilerin tedavisinde büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Enterokoklar plazmid, transpozonlar ve mutasyonlar nedeniyle çoklu antibiyotik direnç genlerini taşımakta ve aktarmaktadırlar.<sup>16</sup> Enterokoklarda 1980'li yılların sonlarından itibaren yüksek düzey aminoglikozid direnç (YDAD) artışı gözlenmektedir. Yüksek düzey aminoglikozidlere karşı görülen direnç, beta laktamlar ile arasındaki sinerjistik etkinin ortadan kalkmasına yol açması nedeniyle özellikle endokardit gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde sorunlara sebep olmaktadır. Enterokoklarda YDAD'ne baskın olarak, iki işlevli aminoglikozid modifiye edici enzim AAC (6')-APH (2')'yi kodlayan *aac (6')-Ie-aph(2')-Ia* geni aracılık etmektedir. *Aph (2')-Ib*, *aph (2')-Ic* ve *aph (2')-Id* gibi aminoglikozidleri modifiye edici enzim genleri de enterokoklarda YDAD'nden sorumlu tutulmaktadır. Ülkemizde 2016 yılı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) raporuna göre yüksek düzey gentamisin direnci *E. faecalis*'te %57,2, *E. faecium*'da %61,7 olarak bildirilmiştir. Enterokoklarda YDAD oranlarının oldukça yüksek olması ve enterokokların ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara yol açmaları enterokoklarda dirençle ilişkili genlerin ve direnç oluşumuyla ilişkilendirilen virülans faktörlerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

Ülkemizde YDAD'li enterokok suşlarında, YDAD direnç genlerini belirleyen ve bu izolatlarda virülans faktörlerini değerlendiren çok az sayıda çalışma mevcuttur.

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Labortauvarı'na gelen çeşitli klinik örneklerden üretilen yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok suşlarındaki; dirençten sorumlu genlerin araştırılması, virülans faktörlerinin ve biyofilm aktivitesinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle saptanması ve direnç genleri ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız ile; hastanemizdeki direnç profili hakkında bilgi edinilecek ve klinik duruma etkisi gösterilecektir. Ayrıca hastane kaynaklı salgınların önlenmesi için elde edilen veriler ile hastane sürveyansına katkıda bulunulacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Enterokokların tarihçesi

Enterokok, ilk kez 1899 yılında Thiercelin tarafından Fransa’da yayınlanan bir çalışmada ‘*enterocoque*’ olarak adlandırılmıştır.<sup>17</sup> Ardından Alexander Gordon ve S.houston, hayvan dışkısı ve kanalizasyon suyunda çok miktarda fekal streptokok bulunduğunu saptamışlardır. Andrews ve Horder ise 1906 yılında endokarditli bir hastanın kanından izole ettikleri bu bakteriyi *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*) olarak adlandırmışlardır.<sup>18</sup> Orla-Jensen 1919 yılında karbonhidratları fermente etme özelliği bakımından *S. faecalis* türünden farklılık gösteren türü *Streptococcus faecium* (*S. faecium*) olarak isimlendirmiştir.<sup>19</sup> 1933 yılında Lancefield serolojik testlerle bu bakteriyi D grubu streptokoklara dahil etmiştir. Helen U. Wing ve M. Sherman sırasıyla 1935 ve 1937 yıllarında *S. faecium*’a benzer özellik gösteren ve daha az fermentasyon yapan 3. bir tür olan *Streptococcus durans* ‘ı tanımlamışlardır. 1937 yılında ise Sherman antijenik yapılarını, hemoliz, biyokimyasal ve üreme özelliklerini dikkate alarak streptokokları; piyojenik, viridans, laktik asit üreten streptokoklar ve enterokoklar olarak dört gruba ayırmıştır. Nowlan ve Deibel 1967 yılında *Streptococcus avium*’u tanımlamışlardır. Enterokoklar 1984 yılına kadar D grubu streptokok cinsi altında yer almış, 16S rRNA dizi analizi, DNA hibridizasyonu ve total hücre protein profil analizi gibi gelişmiş moleküler tanı ve tiplendirme çalışmalarının yaygınlaşmasıyla birlikte enterokokların, *Streptococcus* genusunda olmadığı anlaşılmıştır. 1984 yılında Schleifer ve Kilpper–Balz tarafından *Enterococcus* cinsi olarak yeniden isimlendirilmişlerdir.<sup>20</sup>

### 2.2. Enterokokların genel özellikleri

Enterokokların hücre duvarında %40 oranında peptidoglikan bulunmaktadır ve çoğunluğu antijenik özellikte teikoik asit, lipoproteinler ve yüzey protein antijenleri içermektedir. Dış membranı yoktur. Bu özellikleri ile diğer gram pozitif kokların hücre duvar yapısına benzemektedir. Enterokokların %80’inde bulunan D grubu antijenik özelliğini, hücre duvarı ile bağlantılı olan gliserol teikoik asit vermektedir.<sup>21</sup>

Enterokoklar, 0.6-2.5 µm boyutunda, gram pozitif kok ya da nadiren kokobasil şeklinde, tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde görülebilen, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob bakterilerdir.<sup>6</sup> Kanlı agarda gri, parlak ve buğulu görünümlü koloniler oluştururlar. Alfa, beta veya gama hemoliz oluşturabilirler.<sup>7,22,23</sup> Sıvı



besiyerinde bulanıklık oluşturmadan dipte çökelti yaparak ürerler.<sup>24,25</sup> Enterokokların bazı türlerinde az miktarda katalaz enzimi üretilmektedir (psödokatalaz). Psödokatalaza sahip enterokok türleri tam katalaz enzimi üreten bakteriler gibi sitokromları eksprese edemezler.<sup>26</sup> Fermentasyon yoluyla karbonhidratları gaz oluşturmadan laktik aside dönüştürürler. Bakteriyosin üreten laktik asit bakterileri grubuna dahil mikroorganizmalardır. Enterokoklar çoğunlukla hareketsiz olup, bazı türleri (*E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*) hareketlidir. Optimum üreme sıcaklığı 35 °C’de olmak üzere 10-45 °C arasında değişen sıcaklık aralığında üreyebilmektedirler. İstisna olarak *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*’in 45 °C’de, *E. cecorum* ve *E. columbae*’nin ise 10 °C’de üreyemediği saptanmıştır.<sup>27-29</sup> *E. faecalis* ve *E. faecium*’un 30 dakika 60 °C’ye kadar olan sıcaklığa dayanıklı olduğu görülmüştür.<sup>12</sup> Asit ya da alkali ortama, yüksek sıcaklığa, hiperosmolarite, safra tuzu ve kimyasal ajanlara hızlı uyum sağlayarak uygunsuz ortam koşullarına direnç göstermektedirler.<sup>12,30</sup> Enterokokların çoğu %6,5 NaCl içeren ortamda üreyebilmekte ve %40 safra tuzu varlığında eskülini hidroliz edebilmektedir.<sup>3</sup> Ancak enterokok türlerinden *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* ve *E. columbae*, % 6,5 NaCl varlığında zayıf bir şekilde büyür veya hiç büyümmez.<sup>31</sup> Enterokok türlerinin çoğu (*E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. canintestini*, *E. devriesei* ve *E. moraviensis*, *E. pallens* hariç), pirolidonil arilamidaz enzimi ile L-pyrolidonyl- $\beta$ -naphthylamid (PYR) maddesini hidrolize etmektedir. Enterokok türlerinin tümü leucine aminopeptidase (LAPase) enzimi ile leucine  $\beta$ -naphthylamide (LAP) yapısını hidroliz etmektedir.<sup>6</sup>

### 2.3. Enterokokların sınıflandırılması

Enterokoklar, *Firmicutes* şubesinde, *Bacilli* sınıfında, *Lactobacillales* takımında, *Enterococcaceae* ailesinde *Enterococcus* cinsi olarak sınıflandırılmaktadır. Günümüzde “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) taksonomik sınıflamasında, *Enterococcus* cinsi içerisinde 70 tür olduğu belirlenmiştir.<sup>32</sup>

Enterokokların filogenetik analizle streptokoklardan çok *Vagococcus*, *Tetragenococcus* ve *Carnobacterium* cinslerine çok daha benzer oldukları saptanmıştır (1. Çizim).

1. Çizim. Enterokok cinsinin 16S rRNA dizi analizi özelliklerine göre hazırlanan filogenetik dendrogram<sup>26</sup>



Enterokoklar moleküler yöntemlerin yanı sıra diğer gram pozitif, katalaz negatif, fakültatif anaerob bakterilerden; %6,5 NaCl içeren ortamda üreyebilmesi, %40 safraya dirençli olması, eskulin ve PYR hidrolizini gerçekleştirebilmesi gibi özelliklerle ayrılmaktadır (1. Çizelge). Enterokokların %80'inde saptanan Grup-D antijeni *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus bovis*, *Vagococcus* gibi cinslerde de görüldüğünden taksonomik sınıflandırmada yeterli kadar yeri olmadığı düşünülmektedir.

1. Çizelge. Gram pozitif, katalaz negatif kokların fenotipik ve biyokimyasal özellikleri<sup>33-36</sup>

Cins veya türler	Fenotipik Özellikler									
	Morfoloji	LAP	NaCl	10 °C	45 °C	EH	Van	Haraket	PYR	Gaz
<i>Enterococcus</i>	Zincir	+	+	D	D	+	S (a)	D	+	-
<i>Streptococcus</i>	Zincir	+	-(d)	-	D	-(c)	S	-	-(b)	-
<i>Lactococcus</i>	Zincir	+	D	+	-(e)	+	S	-	+	-
<i>Vagococcus</i>	Zincir	+	+	+	-	+	S	+	+	-
<i>Leuconostoc</i>	Zincir	-	D	+	-	D	R	-	-	+
<i>Pediococcus</i>	Küme	+	D	-	D	+	R	-	-	-
<i>Tetragenococ</i>	Küme	+	+	-	+	+	S	-	-	-
<i>Aerococcus</i>	Küme	-	+	-	+	D	S	-	+	-

D:Değişken, VAN: Vankomisin (30 µg disk) duyarlılığı, S: Duyarlı, R: Dirençli, PYR: L-pyrolidonyl-β-naphthylamid hidrolizi, EH: Eskulin hidrolizi, LAP: Leucine β-naphthylamide, NaCl: %6.5 NaCl içeren besiyerinde üreme, 10 °C :10 °C'de üreme, 45 °C :45 °C'de üreme +: Pozitif, -: Negatif

- Enterokoklarda bazı türler vankomisine dirençlidir ancak disk etrafında küçük bir inhibisyon zonu gözlenmektedir.
- A grubu streptokoklar PYR pozitif, diğer streptokok türleri negatiftir.
- Viridans grubu streptokokların %5-10'unda eskulin hidrolizi pozitifdir.
- Bazı beta hemolitik streptokoklar %6,5 NaCl içeren besiyerinde üreme gösterir.
- Bazı *Lactococcus* türlerinde 45 °C'de çok yavaş üreme gözlenmektedir.

Enterokokların, karbonhidrat içeren ortamlarda asit üretmeleri, arjinin hidrolizi, pirüvat kullanımı, hareket gibi biyokimyasal ve fenotipik özelliklerine bakılarak tür tayini yapılmaktadır (2. Çizelge).

2. Çizelge. Enterokok türlerin biyokimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması<sup>37</sup>

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

ARA: Arabinoz, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, RAF: Rafinoz, TEL: Tellürit, ARG: Arjinin, PYU: Pirüvat, MGP: Metil-α-D-glikopiranozid, +: Pozitif, -: Negatif, D: Değişken

*E. faecalis*'i diğer enterokok türlerinden ayırt etmede tellürit varlığında üreyebilmesi önemli bir özelliktir.

API Rapid ID 32 Strep, API 20 Strep, Vitek Gram-Positive identifikasyon (GPI) kartı ve Microscan Gram Positive Breakpoint Combo panel gibi otomatize identifikasyon sistemleri enterokok türlerini hızlı tanımlamada günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Tür düzeyinde ayırım sağlayan bu sistemler enzimatik reaksiyonlar ve şekerlerin fermentasyonu

esasına dayanmaktadır. Ayrıca matris aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry, MALDI TOF-MS) tanımlama sistemi ile mikroorganizmaların protein yapılarının iyonizasyonu ve ölçülen değerlere göre elde edilen spektraların grafiksel görüntülerinin sistemin veri tabanındaki referans organizmaya uyumuna göre mikroorganizmaların cins ve türleri tanımlanabilmektedir.<sup>38</sup>

#### 2.4. Epidemiyoloji ve klinik önemi

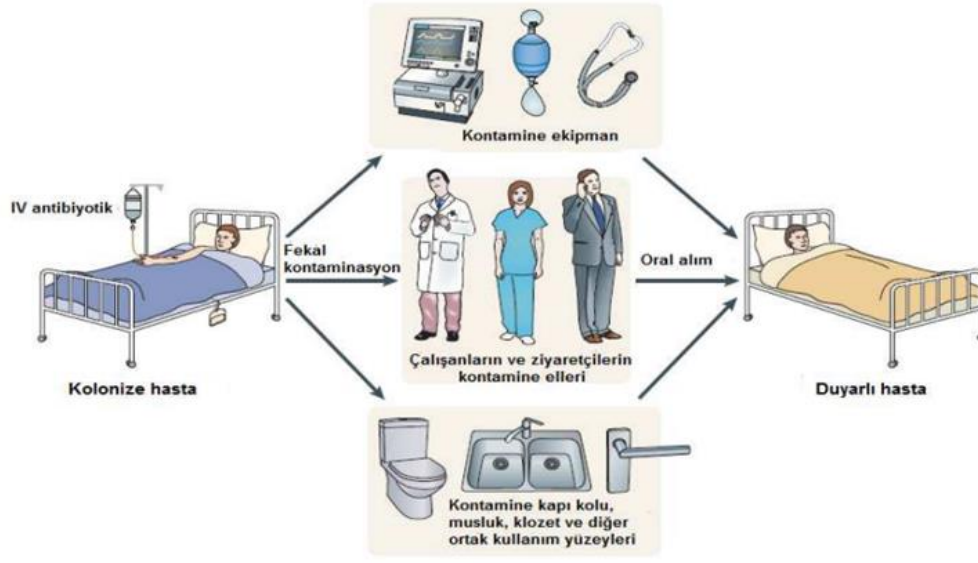
Enterokok türleri toprak, su, bitkiler, kuşlar, böcekler ve memelilerde yaygın olarak görülmektedir. İnsan ve hayvanların çoğunlukla gastrointestinal sisteminde (GİS) daha az sıklıkta da, perineal deri, oral kavite, genitoüriner sistem ve safra yollarında bulunmaktadır.<sup>1</sup> Özellikle besin açısından zengin intestinal sistemde gelişerek insan ve hayvanların dışkılarıyla çevreye yayılmaktadırlar.<sup>39</sup> İnsan dışkısında  $10^5$ -  $10^7$  cfu/ gram *E. faecalis*,  $10^4$ - $10^5$  cfu/ gram *E. faecium* bulunmakta olup toplam enterokok türleri, çoğunluğunu zorunlu anaerob bakterilerin oluşturduğu normal bağırsak mikrobiyotasının %0,01'den azını oluşturmaktadır.<sup>40-42</sup> Enterokoklar fırsatçı patojen mikroorganizmalardır ve gastrointestinal sistem, hastalıklara neden olan enterokok türlerinin önemli bir kaynağı olarak görülmektedir.

Enterokokların enfeksiyon ve kolonizasyon için; immünyüpresyon, maligniteler, üriner veya santral katater gibi invaziv işlemler, renal yetmezlik, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ile hastanede ve yoğun bakımda uzun süre kalma gibi faktörler risk oluşturmaktadır.<sup>43</sup>

İnsanlarda enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ında etken *E. faecalis* iken, kalan %10-20 enfeksiyonda en çok etken olan enterokok türünün *E. faecium* olduğu görülmektedir.<sup>44,45</sup> Ancak son yıllarda klinik örneklerde, antibiyotik direnç oranının *E. faecalis*'e oranla daha yüksek görüldüğü *E. faecium* türlerinin miktarındaki artış dikkati çekmektedir.

Enterokoklar çevre koşullarına oldukça dayanıklı olduklarından, kapı kolu, yatak, termometre gibi yüzeyler üzerinde uzun süre canlı kalabilmektedir. Bu sebeple kontamine nesnelere ve sağlık personelinin elleriyle hastadan hastaya taşınarak nozokomiyal salgınlara yol açabilmektedirler.<sup>46,47</sup> 2. Çizim'de nozokomiyal enterokok yayılımının önemli yolları gösterilmiştir.

## 2. Çizim. Nozokomiyal enterokok yayılımının önemli yolları<sup>48</sup>



### 2.5. Enterokok türlerine bağlı oluşan enfeksiyonlar

Enterokoklar sahip oldukları virülans faktörleri ve antibiyotik direnç mekanizmaları ile, çoğunlukla gastrointestinal sistemden dokulara yayılarak enfeksiyona sebep olmaktadır. Nozokomiyal enfeksiyonların önemli etkenleri arasında gösterilmektedirler. Enterokok türleri üriner sistem enfeksiyonları, karın içi ve pelvik enfeksiyonlar, enfektif endokardit, bakteriyemi, yara ve yumuşak doku enfeksiyonları ve menenjit gibi enfeksiyonlara sebep olmaktadır.<sup>49</sup>

#### 2.5.1. Üriner sistem enfeksiyonları

Enterokokların neden olduğu enfeksiyonların başında üriner sistem enfeksiyonları gelmektedir. Sistit, piyelonefrit, prostatit, perinefritik apse, epididimit şeklinde görülmektedir. Sıklıkla nozokomiyal enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Enterokoklar, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonu olan hastalardan ikinci sıklıkla izole edilmektedir. Üriner katater ve sistoskopi gibi invaziv işlemler ile üriner sistem anomalileri önemli risk faktörlerindedir.<sup>50-52</sup>

#### 2.5.2. Enfektif endokardit

Enfektif endokarditlerin %5-20'sinden etken olarak enterokoklar sorumlu tutulmaktadır.<sup>53</sup> Enfektif endokarditin üçüncü en sık etkeni olarak gösterilmektedir.<sup>54</sup>

Enterokok türlerinden en sık *E. faecalis* izole edilmektedir. Çoğunlukla sol taraf endokarditine neden olmaktadır ve mitral kapağın, aort kapağına göre daha sık tutulduğu bildirilmiştir.<sup>55</sup>

Dejeneratif kapak hastalığı, protez kapak operasyonları, IV ilaç kullanımı gibi durumlar risk faktörlerini oluşturmaktadır.<sup>54</sup> Enterokokal endokardit subakut bir seyir göstermektedir. En yaygın klinik belirtiler üfürüm, ateş, kilo kaybı ve halsizlik olarak gösterilmiştir. Yaşlı ve immunsupresif kişilerde mortalite oranının yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>56</sup>

### **2.5.3. Bakteriyemi**

Enterokok kaynaklı bakteriyemi, enterokoklara bağlı endokarditten daha sık görülmektedir.<sup>57</sup> Enterokoklar, bakteriyemilerin en sık görülen 3. etkeni olarak gösterilmektedir.<sup>58</sup> Enterokok bakteriyemileri genellikle polimikrobiyal şekilde görülmektedir. Sıklıkla üriner sistem ve karın içi enfeksiyonlar, intravenöz veya intraarteriyel kateterizasyon sorumlu tutulmaktadır.<sup>59</sup>

### **2.5.4. Karın içi ve pelvik enfeksiyonlar**

Enterokoklar gastrointestinal sistemde florada olmaları sebebiyle, karın içi ve pelvik enfeksiyonlarında en çok izole edilen türlerdendir.<sup>60</sup> Enfeksiyonlar genellikle polimikrobiyaldir.<sup>61</sup> Peritoneal diyalizli hastalarda, abdominal cerrahi ya da travma komplikasyonlarında peritonitin sık etkenlerinden biri olduğu gösterilmiştir. Akut salpenjit veya endometrit komplikasyonu olarak apse veya bakteriyemiye neden olabilmektedirler.<sup>60</sup>

### **2.5.5. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları**

Enterokoklar, selülit ve yumuşak doku enfeksiyonlarına nadiren neden olmaktadır. Cerrahi ve yanık yaraları, diyabetik ayak, dekübit ülserleri, osteomyelit ve septik artrit neden olabilmektedir. Sıklıkla polimikrobiyal enfeksiyonlardan izole edilmektedir.<sup>62</sup>

### **2.5.6. Menenjit**

Sağlıklı erişkinlerde enterokoklar nadiren menenjit etkenidir. Bakteriyel menenjit vakalarının sadece %0,3-%4,0'ünü oluşturmaktadır. Enterokokal menenjit daha çok kafa

travması, beyin omurilik sıvısı (BOS) kaçağı, cerrahi girişim sonrası veya santral sinir sisteminde anatomik defekti olan hastalarda görülmektedir.<sup>63</sup>

### **2.5.7. Diğer enfeksiyonlar**

Enterokok türleri daha nadir olarak otit, endoftalmit, osteomyelit, artrit, pnömoni, periodontit ve sinüzit etkeni olarak saptanmışlardır.

## **2.6. Virülans ve patogenezi**

### **2.6.1. Adezyon**

Kromozomal virülans faktörü ve direnç mekanizmalarına ya da plazmitler ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile aktarılmış virülans genlerine sahip enterokok türleri konak dokulara tutunarak enfeksiyona yol açmaktadır.

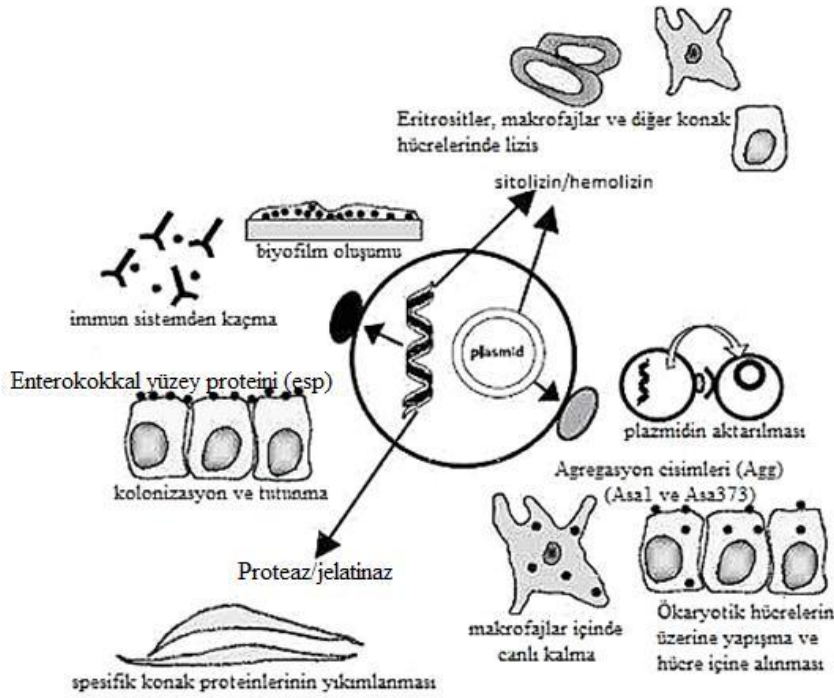
Patogenezi en önemli unsur enterokokların yüzeyinde bulunan adezinleri ile konak epitel/endotel hücre reseptörlerine veya hücre dışı matris proteinlerine adezyonudur. Gastrointestinal sistemde adezinleri olmayan enterokoklar konak reseptörlerine bağlanamadığından dokulara invaze olamaz ve bağırsak hareketi ile lümeninden uzaklaştırılır.<sup>64</sup> Ayrıca membran glikolipidleri, insan kolon mukozal hücrelerinin yüzeyinde ve/veya hücre dışı matrisinde bulunan heparin ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlara bağlanarak adezyonda önemli rol oynamaktadır.<sup>1</sup>

### **2.6.2. Enterokokların virülans faktörleri**

Virülans faktörleri konak dokuya adezyonu, invazyonu ve kolonizasyonunu sağlayarak, doku yıkımını kolaylaştırarak ve konak bağışıklık sistemini etkileyerek enfeksiyonun patogenezi katkıda bulunmaktadır.<sup>65</sup> Enterokoklardaki virülans, genomdaki patojenite adaları ve plazmidlerde kodlanan virülans genler ile sağlanmaktadır.<sup>66,67</sup>

Enterokoklarda bazı virülans faktörleri; agregasyon faktörü, enterokok yüzey proteini, *Enterococcus faecalis* Antijen A Proteini, jelatinaz, sitolizin ve hyaluronidaz (hyl)' dir (3. Çizim).<sup>68</sup>

### 3. Çizim. Enterokoklara ait virülans faktörleri



#### 2.6.2.1. Agregasyon maddesi

Agregasyon maddesi, enterokokların konak hücrelerine yapışmasında önemli rol oynayan feromonla uyarılan konjugatif plazmitlerin kodladığı yüzey proteinleridir.

AS oluşumuna neden olan *agg* geninin *asp1*, *prgB*, *asa1* ve *asc10* gibi çeşitli varyantları bulunmaktadır. Bu genler tarafından kodlanan proteinlerden en çok incelenenler *asa1*, *asp1* ve *asc10* agregasyon maddesi glikoproteinleridir. Glikoproteinlerde %90'ın üzerinde aminoasit dizi benzerliği mevcuttur.

AS enterokokların birbirleriyle temas etmelerini sağlar ve bakterilerin kümelenmesine neden olur. Bu durum antibiyotik direnç ve virülans genlerini taşıyan plazmidlerin transferini kolaylaştırmaktadır.

AS kompleman reseptörü tip 3 aracılığıyla opsonizasyondan bağımsız olarak nötrofillere bağlanabilmekte ve bu bağlanma ile nötrofillerin bakterileri öldürmesi engellenmektedir. Ayrıca yüzey hidrofobitesini artırarak lizozomal veziküllerde fagozomun birleşmesini zorlaştırmaktadır. T hücre proliferasyonunu uyarır ve makrofajlardan TNF- $\alpha$ , T hücrelerinden TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  salınımını uyarır.<sup>69,70</sup>



AS’de bulunan arjinin-glisin-aspartik asit motifi, reseptörünü taşıyan bağırsak epiteli, böbrek tübüler hücreleri, endokardiyal vejetasyonlar ve nötrofile bağlanarak adezyonu gerçekleştirmektedir. Özellikle endokardit ve üriner sistem enfeksiyonlarında önemli virülans faktörlerinden biri olup yapılan çalışmalarda nozokomiyal enterokok etkenlerinde daha sık saptandığı görülmüştür.<sup>71</sup>

#### **2.6.2.2. Ekstrasellüler Yüzey Proteini**

Hücre duvarı ile ilişki yüksek moleküler ağırlığa sahip protein olup patojenite adacıklarında *esp* geni tarafından kodlanmaktadır.<sup>72</sup> Konjugasyon ile enterokok suşları arasında transfer edilebilmektedir. Esp konak dokulara adezyon, kolonizasyon ve konak immün yanıtta kaçışta rol oynamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda biyofilm oluşumunda önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Latasa ve ark.<sup>73</sup>’nın yaptığı çalışmada *esp* geninde mutasyon saptanan enterokok izolatında biyofilm oluşumunun izlenmediği plazmid aracılığıyla *esp* gen transferi yapıldığında ise biyofilm oluşumunun izlendiği gösterilmiştir.

Başta endokardit, üriner sistem enfeksiyonu ve bakteriyemi olmak üzere daha çok nozokomiyal örneklerden izole edilen enterokok suşlarında *esp* genine rastlanmaktadır.<sup>74</sup>

#### **2.6.2.3. Enterococcus faecalis Antijen A Proteini (EfaA Proteini)**

EfaA proteini ilk kez endokarditli bir hastanın örneğinde tanımlanmış olup özellikle *E. faecalis* suşlarında yüzey antijeni olarak bulunmaktadır.<sup>75</sup> *EfaA* geni tarafından kodlanmaktadır. *EfaA* geni substart bağlayıcı lipoprotein bileşeni kodlamada görevli *EfaBCA* üç genli operonun üçüncü genidir.<sup>76</sup>

*EfaBCA* operonunun, *E. faecalis* için önemli bir mikrobese olan  $Mn^{2+}$ ’nın mevcut olmadığı dokularda veya serumda eksprese edilen yüksek afiniteli bir manganez permeazını kodladığını öne sürmüşlerdir, bu da *EfaA*’nın konak dokularının enfeksiyonu için önemini açıklamaktadır.<sup>77</sup>

#### **2.6.2.4. Hemolizin/Sitolizin**

Sitolizin bakteri yapısında bulunan sitotoksik proteindir. Eritrositleri parçalayarak hemoliz oluşturması nedeniyle hemolizin olarak da adlandırılmaktadır. Eritrositler, polimorf nüveli lökositler (PMNL) ve makrofajlarda litik aktivite göstermelerinin yanında Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.<sup>78</sup> Feromona

duyarlı plazmidlerde ya da patojenite adasında kodlanan *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylLM*, *cylLB*, *cylLA* ve *cylLI*'den oluşan 8 gen bölgesinin kontrolünde üretilmektedir.<sup>79</sup>

*cylLL* ve *cylLS* genleri sitolizin alt ünitesinde kodlanan genler, *cylLM*, *cylLB* ve *cylLA* genleri post-translasyonel mekanizma ile düzenlenen salgısal genler ve *cylLI* geni immun kaçışta rol oynayan gen olup bir operon tarafından kodlanmaktadır. *cylR1* ve *cylR2* genleri ise düzenleyici genlerdir ve farklı bir operon tarafından kodlanmaktadır.

Enterokokların virülansına etkileri konusunda yapılmış birçok çalışmada, sitolizinin enfeksiyonu şiddetlendirdiği gösterilmiştir.<sup>80</sup> Ike ve ark.<sup>81</sup>'nin yaptığı çalışmada; sitolizini pozitif ve negatif *E. faecalis* suşları ile intraperitoneal enjeksiyon uygulanan fareler incelendiğinde, sitolizin negatif suşlar ile 7 günlük enfeksiyondan sonra tüm fareler hayatta kalırken, sitolizin pozitif suşlar enjekte edilen farelerin 4-5 saat içinde öldüğü görülmüştür. Bir tavşan endokardit modelinde ise sitolizin ve agregasyon maddesi pozitif suşlar, enfeksiyonların yüzde 55'inde öldürücü iken sadece agregasyon maddesi pozitif suşlarla enfekte olmuş hayvanlarda yüzde 15 ölümcül olduğu görülmüştür.<sup>82</sup> Ayrıca yapılan klinik çalışmalarda enfeksiyon ile ilişkili hasta örneklerinden izole edilen suşlar ile sağlıklı bireylerin dışkısından izole edilen enterokok suşları sitolizin varlığı açısından karşılaştırıldığında hasta örneklerinden izole edilen enterokok suşlarında sitolizinin daha sık saptandığı gösterilmiştir.<sup>83,84</sup>

#### **2.6.2.5. Jelatinaz**

Bakteriyel proteazlar genellikle bir organizmanın proteoliz yoluyla besin elde etme yeteneğini artıran faktörler olarak kabul edilmektedir. Sıklıkla konak dokulara verilen zararlı ilişkilendirilmektedir. Jelatinaz ilk 1964 yılında Bleiweis ve Zimmerman tarafından *E. faecalis* OG1RF suşunda saptanmıştır.<sup>85</sup>

Jelatinaz enzimi *gelE* geni aracılığıyla üretilmekte olup kollajen, fibrinojen, fibrin, jelatin, kazein, insülin, hemoglobün ve diğer bazı biyoaktif küçük peptidleri hidrolize edebilmektedir. Çinko içeren matriks metalloproteinaz ailesinin bir üyesi olup üretimi *fsr* gen bölgesi tarafından kontrol edilmektedir.<sup>86</sup> Bu bölge, salgılanan çeşitli proteinlerin ve toksinlerin ekspresyonunu pozitif olarak düzenleyen ve yüzey proteinlerinin ekspresyonunu regüle eden bir çekirdek algılama sistemi olan *S. aureus*'taki *AGR* lokusuyla önemli benzerlik taşımaktadır.<sup>87</sup> *fsr* gen bölgesinin mikrodizisi incelendiğinde virülans ve metabolik yollarda etkili genlerin ekspresyonunu aktive ettiği saptanmıştır.<sup>9</sup>

Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde jelatinaz pozitif *E. faecalis* suşları ile enfekte hayvanlarda negatif suşlara göre kliniğin daha ağır seyrettiği görülmüştür.<sup>88,89</sup>

Jelatinaz, biyofilm oluşumu sürecine katkıda bulunan önemli bir proteinazdır. *fsr* gen lokusunda meydana gelen mutasyonlar biyofilm sentezinde azalmaya neden olmaktadır.

#### **2.6.2.6. Hiyaluronidaz**

Hiyaluronidaz enzimi, bakteri kromozomlarında *hyl* geninde kodlanmakta olup konak dokudaki hyaluronik asidi parçalayarak doku hasarına sebep olmakta ve bakterinin üremesi için besin kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca bağ dokusundaki mukopolisakkaritleri depolimerize ederek konak dokularında yayılmalarını sağlamaktadır. Enterokokların yanında streptokoklar ve stafilokoklar gibi gram pozitif koklarda ayrıca kancalı kurtlar, sülükler, zehirli yılanlar ve spermatozoa gibi ökaryotik hücrelerde de bulunmaktadır.

Dişlerin dentin tabakasında hyaluronik asit bulunmaktadır. Hiyaluronidaz enzimi, bu tabakadaki hyaluronik asidi parçalayarak dişlerin kök kanalından periapikal lezyonlara enterokokların geçişini kolaylaştır ve bu şekilde diş çürüklerindeki doku hasarında rol oynamaktadır.<sup>90</sup> Hiyaluronidaz enzimi, kendi zarar verici etkisinin yanında diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerinin de önünü açarak hasarın büyüklüğünü arttırabilmektedir.

#### **2.6.2.7. Enterokokların adeziv matris moleküllerini tanıyan kollajen bağlayıcı mikrobiyal yüzey bileşenleri (MSCRAMM)**

Enterokokların dokulardaki kolonizasyon ve doku hasarı, konağın hücre dışı özgül matris proteinleri ile enterokokların kollajen bağlayıcı adezin yapılı proteinler arasındaki etkileşim sonucu olduğu düşünülmektedir. *E. faecalis* V583 ve *E. faecium* TX0016 suşlarında, sırasıyla 17 ve 15 adet Enterokokkal kollajen bağlayıcı adezin bulunmuş olup günümüzde 7 enterokokal MSCRAMM ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir: *E. faecalis* için Ace (*E. faecalis* kollajen bağlayan adezin), Fss1, Fss2 ve Fss3 (*E. faecalis* yüzey proteini); *E. faecium* için Acn (*E. faecium* kollajen bağlayan adezin), Scm (*E. faecium*'un ikinci kollajen adezini) ve EcbA (*E. faecium* kollajen bağlayıcı protein A).

Ace'nin enfeksiyonlarda önemli bir rolü olup kollajen tip I ve IV'e bağlanmaktadır. *S. aureus*'un kollajen bağlayan Cna proteiniyle benzerlik göstermektedir.<sup>91</sup> Ayrıca, Ace'nin deneysel olarak endokardit patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Spesifik anti-Ace antikolları verilen sıçanların *E. faecalis* endokarditi geliştirme olasılığının daha düşük olduğu saptanmıştır.<sup>92</sup> Fss1, Fss2 ve Fss3 farklı fibrinojen polipeptit zincirlerini hedef

almaktadır. Acm ise kollajen tip I'e ve daha az ölçüde kollajen tip IV'e bağlanmaktadır. Acm'nin de Ace gibi deneysel olarak endokarditin patogenezinde katkıda bulunduğu gösterilmiştir.<sup>93</sup> Scm ve EcbA'nın her ikisi de kollajen tip V'e ve fibrinojene bağlanmaktadır.<sup>94,95</sup>

#### **2.6.2.8. Lipoteikoik asit (LTA)**

Lipoteikoik asitin lipit kısmı adezyon özelliği göstermektedir. Konağın eritrosit, trombosit, PMNL, lenfosit ve epitel hücrelerine bağlanarak agregasyon faktörü oluşumunu indüklemektedir. Ayrıca TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6, IL8 ve PGE-2 gibi enflamatuvar mediyatörlerin, süperoksit radikallerin ve lizozomal enzimlerin salınımını artırmaktadır.<sup>90</sup>

Plazmit transferini kolaylaştırarak antimikrobiyal direnç gelişmesine de katkı sağladığı gösterilmiştir. Deneysel çalışmalarda *E.hirae* ATCC 9790 suşuna ait lipoteikoik asitin bakteri otolizisini inhibe ettiği gösterilmiştir.

#### **2.6.3. Biyofilm**

Biyofilm, mikroorganizmaların canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak kendi ürettiği hücre dışı polisakkarit (EPS) matriks içinde gömülü halde yaşadığı mikroekosistemdir. Mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak çevresel etkenlerden korunmayı ve besin kaynaklarını daha verimli kullanmayı amaçlamaktadır.<sup>96</sup> Ayrıca mikroorganizmalar biyofilmler sayesinde konak immün yanıtından ve antimikrobiyallerin saldırısından korunabilmektedir. Biyofilmlerde, matrikste gömülü halde yaşayan mikroorganizmalara besin maddelerinin ve oksijenin taşınması su kanalları ile sağlanmaktadır.<sup>97</sup> Biyofilm %15 hücre, %85 matriks materyalinden oluşmaktadır.<sup>98</sup>

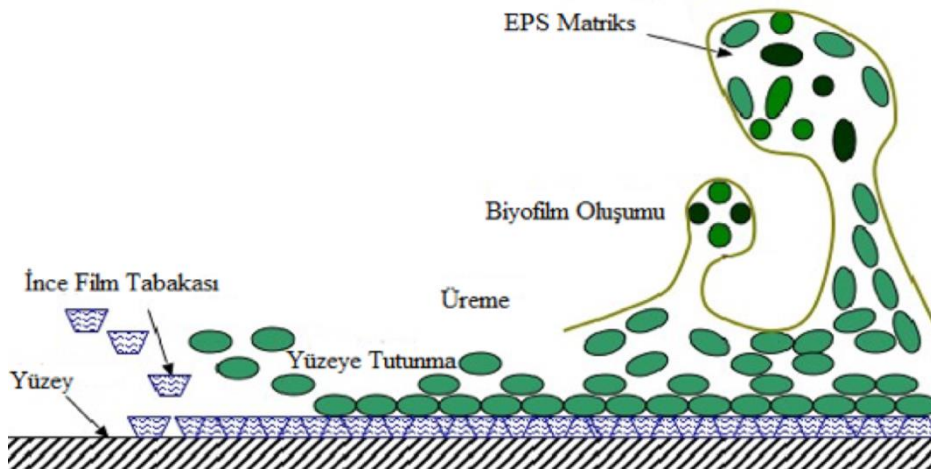
Biyofilmler; kateterler, eklem ve kalp protezleri gibi tıbbi araçları veya kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda solunum yollarını kolonize edebilirler. Hastane kaynaklı enfeksiyonların %65'inden fazlasının etken organizmanın biyofilm üretme kabiliyetinden kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Enterokoklarda biyofilm oluşumunda, pili, serin proteaz ve jelatinaz enzimleri, Ace yüzey proteini ile *esp* ve *gelE* genlerinin rolü olduğu ve bu sayede konakçı dokulara tutunabildiği belirlenmiştir.

Biyofilm oluşumu dört aşamadan oluşmaktadır (4. Çizim).

Uygun ortamda bakteriler yüzey boyunca hareket ederek mikrokoloniler oluştururlar ve yüzeye tutunurlar. Tutunmanın ilk aşaması olan geri dönüşümlü tutunmada, bakteri hücresi ile yüzey arasında, elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçlerinden oluşan zayıf etkileşimler rol alır.<sup>99</sup> Bakterilerin çoğalması ve ekzopolisakkarit madde üretimi ile geri dönüşümsüz şekilde bağlanma sağlanır. Bu şekilde ekzopolisakkarit maddeye gömülü bakteriler soğuk, sıcak, dezenfektan gibi durumlara ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli hale gelmektedir. Biyofilm tabakasında yeterli sayıya ulaşıldığında, bakteri farklı yerlerde kolonize olabilmesi için biyofilm tabakasından koparak yeni ortamlara yerleşmektedirler.<sup>100</sup>

#### 4. Çizim. Biyofilm gelişim aşamaları



Ekstraselüler matrikse gömülü olan bakteriler yüksek antibiyotik direncine ve yüksek gen transfer özelliğine sahiptir.<sup>101</sup> Biyofilm idrar yolu enfeksiyonları ve endodontitlerin yanı sıra endokardit oluşumunda da önemlidir. Enterokoklar endokarditte, kalbin vejetasyon adı verilen hasar bölgelerinde ve kapaklarında biyofilm oluşturmaktadır.<sup>76</sup> Biyofilm oluşumu *Enterococcus* cinsinde en sık *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde saptanmaktadır.<sup>102</sup>

Biyofilm oluşumunda sorumlu genler;

*BopD*: Glikoz bulunan ortamda biyofilm oluşumunu düzenlemektedir ve biyofilm oluşumunda tamir aşamasında rol oynar.

*Fsr* lokusu: özellikle *E. faecalis* regülatörü için *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC* olarak tanımlanan üç gen bölgesi içerir. Adezyon, jelatinaz enzimi sentezinin regülasyonu ve biyofilm oluşumunda etkilidir.<sup>103</sup>

*Ebp*: İlk tutunmada görevli yüzey piluslarının kodlayan gen bölgesidir. Özellikle endokardit enfeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır.<sup>104</sup>

Ayrıca *DltA* (*D-alanine-D-alanil Taşıyıcı Protein Ligaz*), *Epa* (*Enterokokkal Polisakkarit Antijen*), *SrtC*(*sortazC*), *Sal* (*Secretory Antigen Like*) *esp* ve *gelE* genleri, serin proteaz ve jelatinaz enzimleri ile Ace yüzey proteininin biyofilm oluşumunda rolü bulunmaktadır.

## **2.7. Antibiyotik direnç mekanizmaları**

Antibiyotik çağı ilk penisilin ile başlamış ve ardından çok sayıda doğal, sentetik ve semisentetik antimikrobiyal özelliğe sahip ilaç üretilerek enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır.

Antibiyotiklerin keşfi ile eş zamanlı olarak, bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanabileceği ve mevcut antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde etkisini kaybedeceği düşüncesi hakim olmuştur.<sup>95</sup>

Enterokoklar gibi hastane enfeksiyonlarından sık izole edilen patojenlerde, 1900'lü yılların sonlarında düşük oranda çoklu ilaç direnci gösteren suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır. İlk zamanlarda hastanelerde ortaya çıkan bu suşlar zamanla çevreye ve topluma yayılarak klasik antibiyotik tedavisine cevap vermeyen yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyonlar gelişmesine sebep olmuştur.

Bakteriler plazmitlerle, konjugatif transpozonlar aracılığıyla, mutasyonlar ya da insersiyon dizileri ile antibiyotik direnci ve virülans genlerine sahip olmaktadır. Antibiyotik direnç genleri, büyük kompozit elementler üzerinde kombinasyonlar halinde veya tek genler halinde bulunabilmektedir.

Bakterilerde antibiyotik direnci, intrinsik (doğal) ve ekstrinsik (kazanılmış) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Mikroorganizmanın kromozomal DNA'sında bulunan direnç mekanizması 'intrinsik direnç' olarak tanımlanmaktadır. Plazmitler ve transpozonlar aracılığıyla meydana gelen direnç mekanizması ise 'ekstrinsik direnç' olarak ifade edilmektedir.

Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları 5 grup altında incelenmektedir.<sup>105</sup>

1. Bakteri hücresi içine antibiyotik giriřinin engellenmesi ile gelişen direnç,
2. Antibiyotik inaktivasyonu sonucu gelişen direnç,
3. Hedef molekülün değişimi sonucu gelişen direnç,
4. Aktif pompa sistemleri ve hücre duvarı permeabilite değişimi sonucu gelişen direnç,
5. Diğer mekanizmalar

Enterokoklar;  $\beta$ -laktamlar, karbapenemler, sefalosporinler, aminoglikozidler (düşük düzey), linkozamid (düşük düzey), streptogramin, trimetoprim-sulfametoksazol ve glikopeptidlere doğal direnç;  $\beta$ -laktamlar, aminoglikozidler (yüksek düzey), makrolid, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin, kinolon, glikopeptid ve oksazolidinonlara ise kazanılmış direnç gösterirler (3. Çizelge). *E. faecium*'un bakteriler arasında antimikrobiyal direnç genlerinin edinilmesinde ve transferinde merkezi bir rol oynadığı düşünölmektedir.<sup>106</sup>

3. Çizelge. Enterokokların doğal ve kazanılmış direnç gösterdiği antibiyotikler<sup>107</sup>

Direnç	Antibiyotik	Enterokok türü	Direnç mekanizması
<b>Doğal Direnç</b>	B-laktamlar	Tüm enterokoklar	Düşük afiniteli penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)
	Aminoglikozidler (düşük düzey)	Tüm enterokoklar	Yetersiz alım
	Aminoglikozidler (orta düzey)	<i>E. faecium</i>	Kromozal AAC (6')'lı enzimin üretimi
	Linkozamidler ve Streptograminler	<i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	İlaç efluksu
	Glikopeptidler (düşük düzey)	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	D-Ala-D-Ser ile biten peptidoglikan öncülerinin üretimi
<b>Kazanılmış Direnç</b>	Ampisilin (yüksek düzey)	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. hirae</i>	PBP 5'te aşırı üretim veya değişiklikler
	Aminoglikozidler (yüksek düzey)	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	Aminoglikozidleri modifiye edici enzimler
	Makrolidler	Çoğu enterokok türü	Ribozomal metilasyon
	Kloramfenikol	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	CAT kodlama enzimleri
	Tetrasiklin	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	Ribozom proteinin modifikasyonu
	Kinolonlar	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	DNA giraz ve Topoizomeras IV'teki değişiklikler
	Glikopeptidler (yüksek düzey)	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	Öncü modifikasyon
	Oksazolidinonlar	<i>E. faecium</i>	23S rRNA genindeki mutasyon

Özellikle yüksek düzey aminoglikozid,  $\beta$ -laktam ve glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç enterokok kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.



### 2.7.1. $\beta$ -laktam direnci

$\beta$ -laktam antibiyotikler kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşımaktadırlar. Bakteri hücre duvarının temel yapısını oluşturan peptidoglikanın sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki göstermektedir. Ampisilin ve penisilin, enterokoklara karşı en aktif olan  $\beta$ -laktamlardır.

PBP'ler, hücre duvarı sentezinin temel elemanıdır. A ve B sınıfı olarak 2 gruba ayrılmaktadır. A sınıfı hem D,D-transpeptidaz hem de transglikosilaz aktivitesine sahip iken B sınıfının sadece transpeptidaz aktivitesi mevcuttur.<sup>108</sup> Enterokok türleri en az beş farklı PBP'ye sahiptir.<sup>109</sup>

$\beta$ -laktamların etkisine karşı direnç, düşük afiniteli PBP'lerin üretilmesi ve özellikle de PBP-5'in miktarıyla orantılıdır.

Beta-laktamazlar,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerdeki  $\beta$ -laktam halkasının amid bağlarını parçalayarak bu antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. ABD'de birkaç  $\beta$ -laktamaz üreten *E. faecalis* izolatu tanımlanmıştır.<sup>110</sup>

Mainardi ve ark.<sup>111</sup> 2000 yılında yaptıkları çalışmada, bir *E. faecium* laboratuvar mutantında yeni bir  $\beta$ -laktam direnci mekanizması tanımlamışlardır. Bu suşta, hücre duvarı uzaması sırasında çapraz bağlanma, olağan  $\beta$ -laktama duyarlı DD-transpeptidasyonu şeklinde değil LD-transpeptidasyonu ile meydana geldiğini göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda klinik örneklerden izole edilen enterokok türleri değerlendirildiğinde *E. faecium* suşunun *E. faecalis*'e göre penisilin direncinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

### 2.7.2. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozidlerin bakteri hücreesindeki hedefleri ribozomlardır. Aminoglikozidler ribozomların 30 S alt birimine bağlanarak translasyonu bozmakta ve protein sentezini inhibe etmektedirler.

Aminoglikozidlerin hücre membranından transportu oksijene bağımlı enerji gerektiren bir olaydır. Enterokoklarda sitokrom enzimleri bulunmadığından antibiyotiklerin hücre içi alımında gerekli enerjiyi üretemezler. Bu nedenle enterokokların tümü 4-256 ug/mL arasında değişen minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ile aminoglikozidlere karşı

düşük düzeyde intrinsik direnç göstermektedirler. Ampisilin, vankomisin gibi hücre duvarına etkili antibiyotikler ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki ile bakterisidal etki oluşturabilmektedirler.<sup>48</sup>

Aminoglikozidlerde düşük düzey dirençten sorumlu ikinci mekanizma *E. faecium*'da bulunan 6' asetiltransferaz (AAC-6') enziminden kaynaklanmaktadır. Bu enzim aminoglikozidlerin yapısındaki amino grubunda asetil- CoA'yı modifiye ederek direnç oluşumuna neden olmaktadır. Gentamisin dışındaki diğer aminoglikozitlere dirençte rol oynar.<sup>112</sup>

Aminoglikozidlere yüksek düzeyde dirençte ise minimum inhibitör konsantrasyonu >2000 µg/ml'dir. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler ya da aminoglikozidlerin ribozoma bağlanma bölgelerindeki değişiklik sonucu meydana gelmektedir.<sup>112</sup>

Yüksek düzey aminoglikozid direncinden en sık aminoglikozid modifiye edici enzimler sorumlu tutulmuştur. Aminoglikozidleri modifiye ve inaktive edici enzimler olan adeniltransferaz (ANT), asetiltransferaz (AAC) ve fosfotransferaz (APH) enzimleri tarafından gerçekleştirilen direnç mekanizmalarıdır. Plazmid ya da transpozonlar aracılığıyla aminoglikozid modifiye enzimleri (AME) kodlayan genler enterokoklar arasında aktarılmaktadır. Enterokoklarda yüksek seviyeli aminoglikozid direncine baskın olarak, iki işlevli aminoglikozid modifiye edici enzim AAC (6')-APH (2')'yi kodlayan *aac (6')-Ie-aph(2')-Ia* geni aracılık etmektedir. *Aph (2')-Ib*, *aph (2')-Ic* ve *aph (2'')-Id* gibi aminoglikozid direncine neden olan diğer AME genleri de enterokoklarda tespit edilmiştir. Ayrıca enterokoklarda yüksek seviyeli streptomisin ve kanamisin direncine *aph (3')-IIIa* aracılık etmektedir.<sup>113</sup>

Ribozomal direnç bakteriler arasında nadir görülmekle birlikte, ribozomlarda meydana gelen aminoasit değişikliği sonucu meydana gelmektedir. Bu durum antibiyotiğin ribozoma bağlanmamasına ya da düşük afiniteye neden olmaktadır. Ribozomal direnç sonucunda bütün aminoglikozid gruplarına karşı direnç izlenmektedir.

Enterokokların neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde, hücre duvarına etki eden antibiyotikler ve aminoglikozid (çoğunlukla gentamisin) kombinasyonu öncelikli olarak kullanılmaktadır. Enterokoklarda β-laktam ve gentamisine karşı yüksek düzey direnç tedavide ciddi sorunlara yol açmaktadır.

### 2.7.3. Glikopeptid direnci

Glikopeptid grubu antibiyotikler, peptidoglikan öncüllerinin peptidil-D-Ala-D-Ala terminal uç kısmına bağlanarak hücre duvarı sentezindeki aşamaları inhibe etmektedir. Vankomisin 1958 yılında FDA'nın onayı ile klinik kullanıma girmiş olan ilk glikopeptid türü antibiyotiktir. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının artışı ile 1980'li yılların başından itibaren vankomisin kullanımı giderek artmaya başlamıştır. Teikoplanin, vankomisin ile yapısal olarak ilişkilidir ve *Actinoplanes teichomyceticus*'un fermente edilmesiyle üretilmiştir.<sup>114</sup>

Glikopeptidlere direnç doğal ya da kazanılmış direnç şeklinde görülebilmektedir. Glikopeptid direnci, D-Ala-D-Lac (*VanA, B, D ve M*) veya D-Ala-D-Ser (*VanC, E, G, L ve N*) ile biten modifiye peptidoglikan öncüllerinin üretimini katalize eden enzimleri kodlayan *van* operonlarının varlığından kaynaklanmaktadır. Ortamda vankomisin gibi bir indükleyici ajan varlığında, sensör kinaz enziminin bir regülatör yanıt proteini ile ilişkiye girmesiyle dirençten sorumlu genlerin transkripsiyonu uyarılır. Bunun sonucunda vankomisinin çok düşük bir ilgi ile bağlanabildiği hücre duvarı öncüllerinin oluşumuna neden olan ligaz enzimleri oluşmaktadır. Sonucunda hücre duvarı sentezi inhibisyonu engellenmektedir.

Enterokoklarda saptanan vankomisin direnci her biri tipik bir *van* fenotipine karşılık gelen farklı *van* genotipleriyle ilişkilidir. Günümüze kadar enterokokların glikopeptidlere karşı direncini sağlayan *vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM* ve *vanN* olarak adlandırılan dokuz farklı gen kümesi saptanmıştır.<sup>108</sup>

**VanA tipi direnç:** Tn1546 traspozonu üzerinde bulunan *vanA* geni tarafından kodlanmakta olup enterokoklarda en sık görülen glikopeptid direncidir. Vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde direnç izlenmektedir. Enterokoklar içinde en çok *E. faecium*'da görülmektedir.<sup>115</sup> Hem vankomisin hem de teikoplanin tarafından direnç geni oluşumu indüklenmektedir. Glikopeptidlerin sıklıkla kullanılması enterokoklarda VanA tipi direncinin tetiklenmesine neden olmaktadır.<sup>116</sup>

**VanB tipi direnç:** *VanB* gen kümesi tarafından sentezlenen Van B membran proteini ile oluşmaktadır. *VanB* geni Tn1547 traspozonu tarafından kodlanmaktadır. Van B tipi direnç ilk 1989 yılında tespit edilmiştir. Vankomisin direnci orta düzeyde iken teikoplanine direnç izlenmemektedir. *VanB* kümesindeki genlerin *VanA* gen kümesi ile %77 oranında

benzerlik gösterdiği saptanmıştır. VanA tipi dirençten sonra en sık görülen fenotiptir.<sup>117</sup> *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde görülmektedir.

**Van C tipi direnç:** Van C membran proteinince oluşturulan indüklenemez bir dirençtir.

Van C tipi vankomisin direncini kodlayan genler endojeniktir ve aktarılamaz.

*Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* ve *Enterococcus flavescens*

suşlarında tespit edilmiş olup, vankomisine düşük düzeyde direnç izlenirken teikoplaninde direnç izlenmemektedir.<sup>118</sup>

**VanD tipi direnç:** *E. faecium*'da tespit edilmiştir. Orta düzeyde vankomisin direnci ve düşük düzeyde teikoplanin direnci mevcuttur. İndüklenebilir bir direnç olup VanD proteini sorumludur. Gen kümeleri *VanA* ve *VanB* ile benzerlik göstermektedir.<sup>119</sup>

**VanE tipi direnç:** İlk kez *E. faecalis* BM4405 suşunda tanımlanmış olup vankomisine düşük düzeyde direnç gözlenirken teikoplaninde direnç izlenmemektedir. İntrinsik bir direnç olup aktarılamaz. Fenotipik ve biyokimyasal olarak VanC'ye benzemektedir.<sup>120</sup>

VanG ve VanL tipi dirençler ilk *E. faecalis* suşlarında saptanmış olup nadir görülmektedir. Vankomisine direnç izlenirken teikoplaninde direnç görülmez.<sup>121,122</sup> VanN direnç tipi ilk *E. faecium* suşunda saptanmıştır ve VanC, VanE, VanG ve VanL ligazları arasında %41 ile %65 arasında benzerlik mevcuttur. VanM tipi direnç ise ilk kez *E. faecium* suşunda tanımlanmış olup, gen kümesi *VanA* ve *Van D*'ye benzerlik göstermektedir.<sup>123</sup>

#### 2.7.4. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin (MLS) direnci

MLS antibiyotikleri, fırsatçı enterokok enfeksiyonlarının tedavisi için alternatif bir tedavi oluşturmaktadır. Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler ribozomun 50S alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedirler. Enterokoklarda MLS direnci, nokta mutasyonları ile hedefin değişimi, 23S rRNA metilasyonu ile bağlanmanın engellenmesi, makrolidlerde bulunan lakton halkasının hidrolizi ve antibiyotiğin efluks pompası ile hücreden atılması şeklindeki mekanizmalarla gerçekleşmektedir. En sık görülen direnç mekanizması *erm* genleri tarafından kodlanan metilaz enzimlerinin 23 rRNA'da konformasyonel değişiklik yapması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunun sonucunda makrolid, linkozamid, streptogramin grubu antibiyotiklerin bağlanması azalmaktadır. Tanımlanmış *erm* genleri arasında enterokoklarda en sık

rastlanan *ermB* genidir. *ermB* direnç geni, kromozomlarda bulunmanın yanında Tn917 transpozonu ile transfer edilebilmekte ve horizontal gen transferi ile de yayılabilmektedir.<sup>124</sup>

*msrA*, *mefA*, *mefE* ve *mreA* genleri efluks pompası ile ilişkili dirençten sorumludur. *MefE* ve *mreA* genleri makrolid direnci ile, *msrA* geni ise makrolid ve streptogramin B direnci ile ilişkilendirilmiştir.<sup>125,126</sup>

### 2.7.5. Kinolon direnci

Kinolonlar enterokoklara karşı orta seviyede aktivite göstermektedir. Klinikte kinolonların sıklıkla kullanılması enterokokların direnç kazanmasına yol açmaktadır. Kinolonlar bakterinin DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek bakterisidal etki göstermektedir.<sup>127</sup> Direnç *GyrA* (DNA giraz alt ünitesi) ve *ParC* (Topoizomeraz IV alt ünitesi) bölgelerinde meydana gelen mutasyonlarla oluşabilmektedir. Diğer bir direnç mekanizması ise efluks pompasıyla antibiyotiğin hücre dışına atılmasıdır. *EmeA* ve *EfrAB* direnç genleri sorumlu tutulmaktadır.

### 2.7.6. Oksazolidinon direnci

Linezolid, geniş spektrumlu bakteriyostatik ajandır. Özellikle çok dirençli gram pozitif mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bakterilerin ribozomal 50S biriminin 23S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedirler. 23S rRNA alt ünitesinde meydana gelen mutasyonlar linezolid direncinin en yaygın mekanizmalarıdır. Mutasyona uğrayan rRNA genlerinin allellerinin sayısı direnç seviyesi ile ilişkilendirilmiştir.<sup>128-130</sup> Linezolid dirençli gram pozitif mikroorganizmalarda en sık bildirilen *G2576T* mutasyonudur.<sup>131</sup>

### 2.7.7. Kloramfenikol direnci

Kloramfenikol, ribozomal 50S birimine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Enterokoklarda, kloramfenikol direnci çoğunlukla kloramfenikolde asetillenmeye sebep olarak ribozoma bağlanmasına engel olan asetiltransferaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Asetiltransferazları kodlayan genler hem kromozomlar üzerinde bulunmakta olup hem de plazmitler ve transpozonlar aracılığıyla taşınmaktadır. Efluks pompası ile kloramfenikolün hücre dışına atılması diğer bir direnç mekanizmasıdır.

Ayrıca dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olan 23S rRNA'da meydana gelen mutasyonlar ya da 23S rRNA metilaz ile hedef bölgenin modifikasyonun da kloramfenikol direncine sebep olduğu gösterilmiştir.<sup>132</sup>

### 2.7.8. Tetrasiklin direnci

Tetrasiklin ribozomların 30 S alt ünitelerine bağlanarak ve amino-açıl tRNA'nın ribozoma tutunmasını engelleyerek bakteriyostatik etki gösteren geniş spektrumlu antimikrobiyaldır.<sup>133</sup> Enterokoklarda tetrasiklin direnci sıklıkla antibiyotik metilasyonunu sağlayan *tetM* geni ile ilişkilendirilmiştir. Antibiyotik metilasyonu ile ilgili *tetO* ve *tetS* gibi başka genler de tanımlanmıştır. Enterokoklarda yaygın olarak bulunan *tetM* geni kromozomlar üzerinde ya da Tn916 konjugatif transpozonu ile taşındığı belirlenmiştir. *tetK* ve *tetL* genleri tetrasiklinin hücre dışına atılmasını sağlayan efluks pompasının kodlanmasında görev almaktadır.<sup>134</sup>

### 2.7.9. Tigesiklin direnci

Tigesiklin, 30S ribozomal alt ünitesine bağlanır ve amino-açıl tRNA'nın hedefe girişini engelleyerek etki göstermektedir. Bu şekilde protein sentezi engellenerek üremeyi durdurmaktadır. Tetrasiklinlerin semi-sentetik analoglarıdır. Tetrasiklin direncinden sorumlu mekanizmalara karşı dirençli olması en önemli özelliğidir.<sup>135</sup> Çoklu antibiyotik dirençli bakteriler de dahil olmak üzere geniş bir etki spektrumuna sahiptir.

Gram pozitif bakterilerde tigesiklin direnci için çok az veri mevcuttur. Cattoir ve ark.<sup>136</sup>'nın yaptığı bir çalışmada genom analizi ile tigesiklin duyarlılığı azalmış dört *E. faecium* suşunda, ribozomal protein geni *rpsJ*'de (30S ribozomal alt biriminin S10 proteinini kodlayan) birkaç mutasyon saptamışlardır. Fiedler ve ark.<sup>137</sup>'nin çalışmasında MFS ya da MATE pompa sisteminin tigesiklin direncinde rol oynadığını saptamışlardır. Ayrıca tetrasiklin direncinden de sorumlu olan *tetM* ve *tetL* gen ekspresyonunun tigesiklin MİK değerlerindeki artışını göstermişlerdir.

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışmaya alınan izolatlar**

2018-2021 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Labortauvarı Bakteriyoloji Birimi'ne gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen MALDI TOF-MS (BioMérieux, Fransa) ile tür tayini yapılmış olan 100 yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Her hastadan tek izolat çalışmaya alınmıştır. İzolatlar çalışmaya başlanacağı zamana kadar boncuklu saklama besiyeri (Or-bak, Türkiye) içerisinde -80°C'de saklanmıştır. Deneyler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Hastalara ait klinik veriler retrospektif olarak hastane bilgi yönetim sistemi üzerinden araştırılmış ve EK 1'de yer alan olgu rapor formlarına bilgiler kaydedilmiştir.

#### **3.2. Tampon çözeltilerin hazırlanması**

##### **3.2.1. Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)**

500 ml 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlamak için; 73.06 g EDTA (Sigma Aldrich, Almanya) tartılıp, manyetik karıştırıcıda 65 °C'de sodyum hidroksit (NaOH) eklenerek 450 ml distile su içerisinde çözülmesi sağlanmıştır. NaOH eklenmesi pH 8.0 olduğunda durdurulmuş ve miktar distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından steril edilmiştir.

##### **3.2.2. Tris (pH: 8.0)**

500 ml 1 M Tris çözeltisi hazırlamak için; 60.57 g Trizma base (Sigma Aldrich, Almanya) tartılarak 450 ml distile suda çözülmüştür. %37'lik hidroklorik asit (HCl) ile pH 8,0'a ayarlanıp miktar distile su ile 500 ml'ye tamamlanıp steril edilmiştir.

##### **3.2.3. Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0)**

20 ml Tris (1 M, pH 8.0) ve 4 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) çözeltileri 1976 ml distile suda karıştırılıp ardından steril edilmiştir.

### **3.2.4. Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE)**

Bir litre 50X TAE çözeltisi hazırlamak için; 242 g Tris Base tartılıp, 750 ml distile suda çözülmesi sağlanmıştır. Üzerine 0,5 M EDTA'dan 100 ml ve glacial asetik asitten 57,1 ml eklenip bir litreye tamamlanmıştır. Kullanılmadan önce 1X olacak şekilde seyreltilmiştir.

### **3.2.5. %1 Kristal Viyole Çözeltisi**

1 g kristal viyole tartılarak, 100 ml steril distile suda çözülmüştür. Filtreden süzdürülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

### **3.2.6. Steril fosfat tamponu**

Ticari olarak satın alınan Phosphate Buffered Saline tabletleri (MP Biomedicals, ABD) kullanılmıştır. Her tablet 100 ml steril distile su içerisinde çözüldükten sonra 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika steril edilmiştir.

### **3.2.7. 0,5 McFarland standardı**

100 ml 0,5 McFarland Standardı için; 0.048 mol/l'lik baryum klorür ( $BaCl_2$ ) çözeltisinden 0,5 ml ve 0,18 mol/l'lik sülfürik asit çözeltisinden 99,5 ml karıştırılmıştır.

### **3.2.8. %96'lık Etanol hazırlanışı**

100 ml %96'lık etanol hazırlamak için; 96 ml etanol üzerine 4 ml distile su eklenerek toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

### **3.2.9. EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (Bio Basic, Canada) içeriği hazırlanışı**

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmadan önce, kit içeriğinde bulunan 12 ml yıkama solüsyonuna, 48 ml %100'lük etanol eklenmiş ve son hacim 60 ml'ye tamamlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanım zamanına kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Kit içeriğinde yer alan 2 mg proteinaz K içeren tüpe 150 ml steril distile su eklenmiştir. Uzun süreli saklama için proteinaz K solüsyonu -20°C'de saklanmıştır.



### **3.2.10. 100 µM'lık stok primer sulandırımı**

100 µM'lık stok primer çözeltileri elde edebilmek için liyofilize halde temin edilen her bir primer dizisi (Sentebiolab, Türkiye), firmanın önerdiği miktarda steril saf su ilave edilerek sulandırılmıştır. Sulandırılan primerler -30 °C'de kullanım zamanına kadar saklanmıştır.

## **3.3. Besiyelerinin hazırlanması**

### **3.3.1. Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri**

Ticari olarak satılan Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya) toz besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri eritildikten sonra 121°C' de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavla (Alp, Türkiye) steril edilmiş ve kullanım zamanına kadar +4 °C'de saklanmıştır.

### **3.3.2. Triptik Soy Agar (TSA) besiyeri**

Ticari olarak satılan Tryptic Soy Agar (Merck, Almanya) toz besiyeri, üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavla sterilize edildikten sonra 45- 50°C' ye kadar soğutulmuştur. Ardından steril petri kutularına ~4mm kalınlıkta olacak şekilde dökülmüştür. Plaklar, oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmış ardından kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

### **3.3.3. Katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyeri (KA-MHB)**

Mueller-Hinton Besiyeri (Merck, Almanya) ticari olarak satın alınmıştır ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. 121°C'de 1 atm basınç altında 15 dakika otoklavla steril edildikten sonra 45-50°C' ye kadar soğuması beklenmiştir. Ardından önceden hazırlanan 10'ar mg/ml kalsiyum ve magnezyum çözeltileri besiyerine ilave edilmiştir. Besiyeri, kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır.<sup>138</sup>

### **3.3.4. Nutrient Gelatin**

Ticari olarak satılan toz besiyeri Nutrient Gelatin (Sigma Aldrich, Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri eritildikten sonra cam tüplere 5 ml hacimde dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatılmıştır. 121 °C'de 1 atm basınç altında 15

dakika otoklavla steril edildikten sonra, dik şekilde katılaşmaya bırakılmıştır. Ardından kullanım zamanına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

### **3.4. Hemolizin üretiminin incelenmesi**

Saklamadan çıkartılıp TSA besiyerine 2 kez pasajlanan izolatlar, %5 koyun kanlı agara ekim yapılarak hemolizin üretimi açısından araştırılmıştır. Plaklar 35±2 °C’de 24-48 saat aerop koşullarda etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında oluşan beta-hemolitik reaksiyon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.<sup>139</sup>

### **3.5. Jelatinaz aktivitesinin incelenmesi**

Cam tüp içerisinde yer alan besiyerine, iğne öze ile 1-1,5 cm derinliğe kadar 4-5 kez batırılarak koloni inokülasyonu yapılmıştır. Koloni inokülasyonu yapılmış tüpler, inokülasyon yapılmamış kontrol tüpü ile beraber 35±2 °C’de 18-24 saat etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından etüvden çıkarılan tüpler +4 °C’de 20-30 dk (kontrol tüpü jelleşene kadar) bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Jelatinde sıvılaşma izlenenler pozitif olarak kaydedilmiştir. Değişiklik izlenmeyenlerin inkübasyonuna 35±2 °C’de 2 hafta süreyle devam edilmiştir. Besiyerleri 2 hafta sürecinde her gün etüvden çıkarılarak ve +4 °C’de 20-30 dk bekletilerek jelatin hidrolizi olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu süreçte jelatinde sıvılaşma izlenen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir. 2 haftalık süre sonunda jelatin hidrolizi saptanmayan tüpler ise negatif olarak kaydedilmiştir. Pozitif kontrol suşu olarak *E. faecalis* ‘ATCC’ 29212 standart suşu kullanılmıştır.<sup>140</sup>

### **3.6. Biyofilm aktivitesinin incelenmesi**

Biyofilm oluşumunu araştırma amacıyla spektrofotometrik mikroplak yönteminden faydalanılmıştır.<sup>141</sup>

Biyofilm oluşturulması için 96 kuyucuklu düz tabanlı ELISA (Corning, ABD) plakları kullanılmıştır.

Plakların her bir kuyucuğuna 180 µL TSB eklenmiştir.

Üç adet kuyucuğa (negatif kontrol kuyucukları) 20 µL TSB eklenerek 200 µL’ ye tamamlanmıştır.

TSA besiyerine pasajlanan izolatlar  $35\pm 2$  °C’de 18-20 saat aerobik ortamda inkübe edildikten sonra her suş için steril tüpler içerisindeki TSB ile 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

Negatif kontrol kuyucukları dışında kalan plak kuyucuklarına, her izolat için üç kuyucuk olacak şekilde 20’şer µL hazırlanan bakteri süspansiyonları eklenmiştir.

Plak üzeri kapatılarak, 37 °C’de 18-20 saat ,100 rpm’de çalkalamalı etüvde (Labnet, ABD) inkübe edilmiştir.

Çok kanallı pipet kullanarak plaklar içindeki herbir kuyucuğa 200 µl’lik steril fosfat tamponu ile oluşan biyofilmlere dokunmadan, kuyucuktaki üst sıvı dikkatlice aspire edilerek üç kez yıkama işlemi yapılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Kuyucuklara 200 µL metanol eklenmiştir. 20 dakika bekletildikten sonra metanol uzaklaştırılarak, plak kurumaya bırakılmıştır.

Ardından 20 µL %1’lik kristal viyole boyası ile boyanmıştır, 15 dk bekletildikten sonra steril fosfat tamponu ile 3 kez yıkama işlemi yapılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Kuruduktan sonra her kuyucuğa 100 µL %95’lik etanol eklenmiştir. Plaklar üzeri kapatılarak bekletilmiştir.

Süre sonunda biyofilm oluşumunu saptamak için ELISA plakları, ELISA plak okuyucusunda (Alisei, İtalya) 620 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak, optik dansite (OD) değerleri belirlenmiştir. Besiyeri optik dansite değerinin iki katı olacak şekilde belirlenen izolatlar pozitif kabul edilmiştir.<sup>142</sup>

Deney, her bir bakteri için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm aktivitesinin değerlendirilmesi için pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ‘ATCC’ 29212, negatif kontrol olarak ise TSB besiyeri kullanılmıştır.

### **3.7. Antibiyotik duyarlılık testleri**

İzolatların ampisilin, siprofloksasin, tigesiklin, teikoplanin, vankomisin ve linezolid antibiyotiklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Antibiyotikler, European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) önerileri ile kullanım sıklıkları göz önüne alınarak seçilmiştir.

Her antibiyotik için kullanılacak dilüsyonlar ‘The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing’ (EUCAST) *Enterococcus spp.* duyarlılık sınır değerinin 3 dilüsyon altı ve direnç sınır değerinin 3 dilüsyon üzerine çıkacak şekilde belirlenmiştir. Ampisilin (Sigma-Aldrich, Almanya), Tigesiklin hidrat (Sigma-Aldrich, Almanya), vankomisin (Sigma-Aldrich, Almanya) ve teikoplanin (Sigma-Aldrich, Almanya), 10 mg/ml olacak şekilde steril distile suda, linezolid (Sigma-Aldrich, Almanya) ise 10 mg/ml olacak şekilde metanol içerisinde çözülmüştür. Siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Almanya), steril distile su içerisinde 0,1 Molar sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinin damlatılmasıyla 10 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür.<sup>143</sup> Antibiyotiklerin hepsi çalışma yapılacağı gün içerisinde hazırlanmıştır.

MİK değerleri EUCAST önerilerince steril U tabanlı ELISA plaklarında, besiyeri olarak KA-MHB kullanılarak saptanmış olup izolatların duyarlılıkları, EUCAST duyarlılık tablolarına göre değerlendirilmiştir (4.Çizelge).

4. Çizelge. *Enterococcus spp* antibiyotik MİK sınır değerleri<sup>144</sup>

Antibiyotik	MİK sınır değeri (mg/L)	
	Duyarlı (S) ≤	Dirençli (R) >
Ampisilin (AMP)	4	8
Siprofloksasin (CİP)	4	4
Tigesiklin (TG)	0,25	0,25
Teikoplanin (TEİ)	2	2
Vankomisin (VAN)	4	4
Linezolid (LNZ)	4	4

Saklamadan çıkartılıp 2 kez pasajlanan izolatlar 35±2 °C’de aerobik ortamda etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. Ardından her izolat için MHB içinde 0,5 McFarland standardına göre bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

Steril U tabanlı ELISA plaklardaki her bir suşa ait satırların onbirinci kuyucuğu üreme kontrol, onikinci kuyucuğu ise sterilit kontrol olarak ayrılmıştır. Kontrol suşu olarak *E.*

*faecalis* 'ATCC' 29212 kullanılmıştır. İlk kuyucuk dışındaki kuyucuklara, 100 µl KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. İlk kuyucuğa ilgili antibiyotik konsantrasyonu ayarlanarak 200 µl antibiyotikli KA-MHB besiyeri eklenmiştir. Ardından en yüksek antibiyotik dilüsyonu olan ilk kuyucuktan başlanarak 100 µl ile aritmetik dilüsyon yapılmıştır. En düşük antibiyotik konsantrasyonlu kuyucuklarda da dilüsyon yapıldıktan sonra artan sıvı tıbbi atığa atılmıştır.

Plak hazırlık aşamasından sonra kuyucuklara inoküle edilecek bakteri miktarı hazırlanan 0,5 McFarland süspansiyonunun 1:10 dilüsyonu ile ayarlanmıştır. Bu bakteri dilüsyonlarından, ilgili kuyucuklara 5 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Böylelikle her bir kuyucuğa,  $\sim 5 \times 10^5$  KOB/ml bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. Plakların kapakları kapatılarak  $35 \pm 2$  °C'de  $22 \pm 2$  saat etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu, "MİK değeri" olarak kaydedilmiştir. *E. faecalis* 'ATCC' 29212 standart suşunun MİK değerlerinin "EUCAST" kalite kontrol tablosundaki beklenen sonuçlar ile uyumlu olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### **3.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)**

Klinik örneklerden izole edilen yüksek düzey aminoglikozid dirençli 100 *Enterococcus spp.* suşunda antibiyotik direnç ve virülans genlerinin belirlenmesi amacıyla konvensiyonel PZR yöntemi uygulanmıştır.

#### **3.8.1. Deoksiribonükleik Asit izolasyonu**

PZR için DNA izolasyonu EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps kit (Bio basic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon işlemi aşamaları;

İzolatların 24 saatlik taze pasajlarından bir öze dolusu koloni, steril bir mikrosantrifüj tüpünde, 1000 µl steril saf su içerisinde çözülmüştür ve 5 dakika 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Süpernatant uzaklaştırılıp 200 µL soğuk TE'de süspanse edilerek kısa süreli vortekslenmiştir.

Üzerine 400 µL lizis solüsyonu eklenip vortekslenmiştir.

Ardından 3 µL Proteinaz K ilave edilerek pipetaj yapılmıştır.

Elde edilen süspansiyon kuru ısıtıcı bloğunda (Eppendorf, ThermoStat Plus, Almanya) 55°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda %100 etanolden 260 µL eklenip vortekslenmiştir.

Süspansiyon 2 ml’lik EZ-10 Spin Column tüpüne aktarılıp 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası tüpte kalan sıvı uzaklaştırılıp üzerine 500 µL yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

Tüpte kalan sıvı uzaklaştırılıp tekrar 500 µL yıkama solüsyonu eklenmiş ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

Tüpte kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra yıkama solüsyonu damlacıkları uzaklaştırılabilmek için 1 dakika daha 10000 rpm’de santrifüj edilmiştir.

EZ-10 Spin Column 1,5 ml steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Kolondaki membranın merkezine 40 µL Elution Buffer eklenmiş 37 °C’de 2-3 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

Elde edilen DNA, kullanım zamanına kadar -20°C’de saklanmıştır.

### **3.8.2. Patogenezden sorumlu virülans genlerinin PZR yöntemi ile belirlenmesi**

DNA izolasyonu yapılmış *Enterococcus spp.* suşlarının virülans genlerinden *asa1*, *gelE* ve *esp* genlerinin varlığının incelenmesi için konvensiyonel PZR yöntemi uygulanmıştır. PZR yönteminde virülans genlerini tespit etmek için kullanılan primerler 5. Çizelge’de gösterilmiştir.

5. Çizelge. Virülans genlerine ait primer dizileri ve moleküler ağırlıkları

Primer	Moleküler Ağırlık (Baz Çifti:bç)	Primer Nükleotid Dizilimi	Referans
<i>asa1</i> (forward) <i>asa1</i> (reverse)	379 (bç)	5'-ggg gccacaatcaaatta gg-3' 5'-gat tcttcgattgtgttata acg-3'	Huycke ve Gilmore <sup>145</sup>
<i>Esp</i> (forward) <i>Esp</i> (reverse)	954 (bç)	5'- ttgctaagtctagtcacgacc-3' 5'-gcg tcaacactgcattgccg aa-3'	Shankar ve ark. <sup>72</sup>
<i>gelE</i> (forward) <i>gelE</i> (reverse)	402 (bç)	5'-agt tcatgtctattttctt cac-3' 5'-ctt cat tat ttacacgtt tg-3'	Mannu ve ark. <sup>146</sup>

Enterokoklarda virülans genlerini tespit etmek için kullanılan PZR yönteminde hazırlanan karışıma ait bilgiler 6. Çizelge'de belirtilmiştir. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım Mannu ve ark.<sup>146</sup>'nın çalışmasından optimize edilerek hazırlanmıştır.

6. Çizelge. Virülans genlerini tespit için PZR reaksiyon karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı (Promega M5122 GoTaq®, ABD), 2X	25 µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
Steril Saf Su	17 µl
İzole DNA	2 µl
Toplam	50 µl

Reaksiyon döngüleri Mannu ve ark<sup>146</sup>'nın çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 7. Çizelge'de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirilmiştir.

7. Çizelge. Virülans genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR koşulları

Gen	Aktivasyon		Denatürasyon		Bağlanma		Uzama		Siklus Sayısı	Son Uzama	
	Isı °C	Zaman (dk)	Isı °C	Zaman (sn)	Isı °C	Zaman (sn)	Isı °C	Zaman (sn)		Isı °C	Zaman (sn)
<i>asaI</i>	95	10	95	45	46	45	72	60	25	72	10
<i>esp</i>	95	10	94	45	63	45	72	60	30	72	10
<i>gelE</i>	94	10	94	60	56	60	72	60	30	72	10

### 3.8.3. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerinin PZR yöntemi ile belirlenmesi

DNA izolasyonu yapılmış *Enterococcus spp.* suşlarının yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerinden *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id* genlerinin varlığının incelenmesi için konvensiyonel PZR yöntemi uygulanmıştır. PZR yönteminde yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerini tespit etmek için kullanılan primerler 8. Çizelge'de gösterilmiştir.



8. Çizelge. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerine ait primer dizileri ve moleküler ağırlıkları<sup>147</sup>

Gen bölgesi	Moleküler Ağırlık (Baz çifti)	Primer nukleotid dizilimi (5'→3')
<i>aac(6')-1e-aph(2'')-1a</i>	505 (bç)	F-gagcaataagggcatacaaaaatc R-ccgtgcattgtcttaaaaaactgg
<i>aph(2'')-1b</i>	906 (bç)	F-tatggattcatggtaactggacgctgag R-attaagcttcctgctaaaataaacatctctgct
<i>aph(2'')-1c</i>	627 (bç)	F-gaagtgatggaaatcccttcgtg R-gctctaacccttcagaaatccagtc
<i>aph(2'')-1d</i>	642 (bç)	F-ggtggtttttacaggaatgccatc R-ccctcttcataccaatccatataacc

PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım Ting-Ting Qu ve ark.<sup>147</sup>'nin çalışmasından optimize edilerek hazırlanmıştır. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerini tespit etmek için kullanılan PZR yönteminde hazırlanan karışıma ait bilgiler 9. ve 10. Çizelge'de belirtilmiştir.

9. Çizelge. *aac(6')-1e-aph(2'')-1a* ve *aph(2'')-1d* genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

Reaktifler	Bir örnek için
Hot Start Green Master karışımı (Promega M5122 GoTaq®, ABD)	12,5 µl
Forward primer (10 µM)	1,5 µl
Reverse primer (10 µM)	1,5 µl
Steril Saf Su	6,5 µl
İzole DNA	3 µl
Toplam	25 µl

10. Çizelge. *aph(2'')*-1*b* ve *aph(2'')*-1*c* genlerinin belirlenmesinde kullanılan PZR karışımı

<b>Reaktifler</b>	<b>Bir örnek için</b>
Hot Start Green Master karışımı (Promega M5122 GoTaq®, ABD)	12,5 µl
Forward primer (50 µM) (2 primer)	0,6 µl
Reverse primer (50 µM) (2 primer)	0,6 µl
Steril Saf Su	8,3 µl
İzole DNA	3 µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

Reaksiyon döngüleri Ting-Ting Qu ve ark.<sup>147</sup>'nin çalışmasından optimize edilerek belirlenmiştir. PZR, 11. Çizelge'de belirtilen koşullarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirilmiştir.

11. Çizelge. Yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerinin tespitinde kullanılan PZR koşulları

Direnç Geni	PZR Koşulları	
<i>aac(6')-1e-aph(2'')-1a</i>	Aktivasyon	94 °C'de 10dakika
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	61 °C'de 1 dakika
	Uzama	72 °C'de 1 dakika
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika
		30 siklus
<i>aph(2'')-1b ve aph(2'')-1c</i>	Aktivasyon	94 °C'de 10dakika
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	55 °C'de 1 dakika
	Uzama	72 °C'de 1 dakika
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika
		30 siklus
<i>aph(2'')-1d</i>	Aktivasyon	94 °C'de 10dakika
	Denatürasyon	94 °C'de 1 dakika
	Bağlanma	53,4 °C'de 1 dakika
	Uzama	72 °C'de 1 dakika
	Son uzama	72 °C'de 10 dakika
		30 siklus

PZR ürünlerini görüntülemek için yatay jel elektroforezi, elektroforez için ise TAE tamponu kullanılmıştır. TAE tamponu içerisinde %2' lik agaroz jel hazırlanmıştır. Temiz bir beher içerisinde 30 ml 1X TAE tamponuna 0,6 g agaroz (Sigma Aldrich, Almanya) koyulup mikrodalga fırında agaroz eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Jelin sıcaklığı yaklaşık 50–55 °C'ye düştüğünde Etidyum Bromür (Sigma Aldrich, Almanya) solusyonundan %0,5 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Elektroforez yatağına taraklar yerleştirildikten sonra içerisine jel dökülmüş ve yaklaşık 30 dakika katılaşmaya bırakılmıştır.

Katılaştıktan sonra taraklar çıkarılmış, jel elektroforez yatağı ile birlikte tanka (Thermo Scientific, ABD) alınmıştır. Jelin üzeri kapanacak şekilde 1X TAE tamponu eklenmiştir. Jeller arasında karşılaştırma yapabilmek için ilk kuyucuğa 5 µl *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* (Thermo Scientific, ABD), diğer kuyucuklara ise örneklere ait PZR ürünlerinden 5

ül yüklenmiştir. Elektroforez tankında 110 V'da 40 dakika yürütülen örnekler, GeneLine ImageSCI (Spectronics Corp., ABD) jel görüntüleme sisteminde değerlendirilmiştir.

### **3.9. Etik kurul onayı**

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Kurul'undan etik kurul onayı alınmıştır (Karar no: KÜ GOKAEK-2021/5.08 Proje no: Proje No: 2021/61 Tarih: 04/03/2021).

### **3.10. Proje desteği:**

Çalışmada gerekli malzemelerin temini için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne Tıpta Uzmanlık Tez projesi desteği için başvurulmuştur. Tez projesi ilgili birim tarafından onaylanıp, yürürlüğe girmiştir (Proje kodu: 2021/ 2547).

### **3.11. İstatistik**

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile yapılmıştır. Çalışmada yer alan değişkenler frekans (yüzdeler) olarak verilmiştir.

Gruplar arası farklılıkları değerlendirmek amacı ile kategorik değişkenlerde Fisher's Exact kıkare testi, Yates' kıkare testi ve Monte Carlo kıkare testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  iki yönlü testlerde istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edilmiştir.

### **3.12. Referans suşlar**

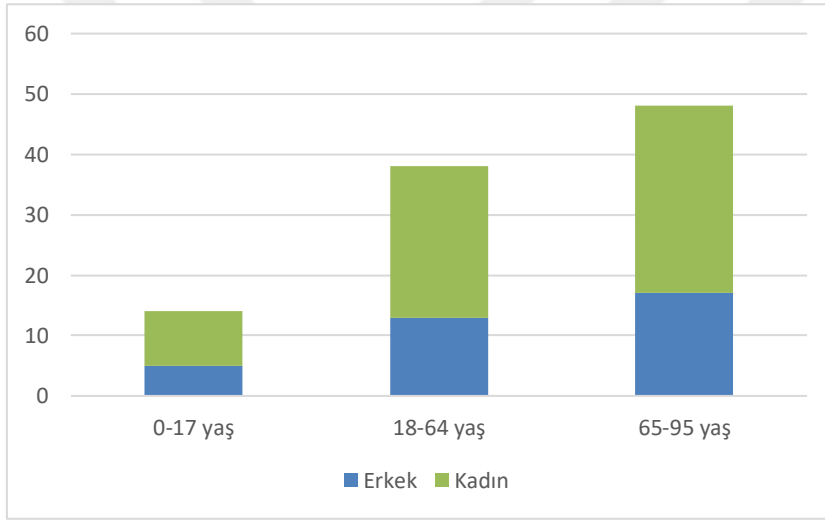
Jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretiminin değerlendirilmesinde pozitif kontrol suşu olarak, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde ise kalite kontrol amacıyla *E. faecalis* "ATCC" 29212 kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında ise pozitif kontrol suşu olarak *E. faecalis* "ATCC" 29212 ve *E. faecalis* "ATCC" 51299 standart suşları kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolatların genel özellikleri

Çalışmaya 2019-2021 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Labortauvarı'na gelen hasta örneklerden izole edilen 100 yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok izolatu dahil edilmiştir. İzolatların, 35'i erkek, 65'i kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların en küçüğü 5 aylık, en büyüğü 95 yaşında olup yaş ortalaması 57,92'dir. Hastaların 14'ü 17 yaş ve altında, 38'i 18-64 yaş arasında, 48'i ise 65 yaş ve üstüdür (5. Çizim).

### 5. Çizim. Hastaların yaş ve cinsiyetlere göre dağılımı



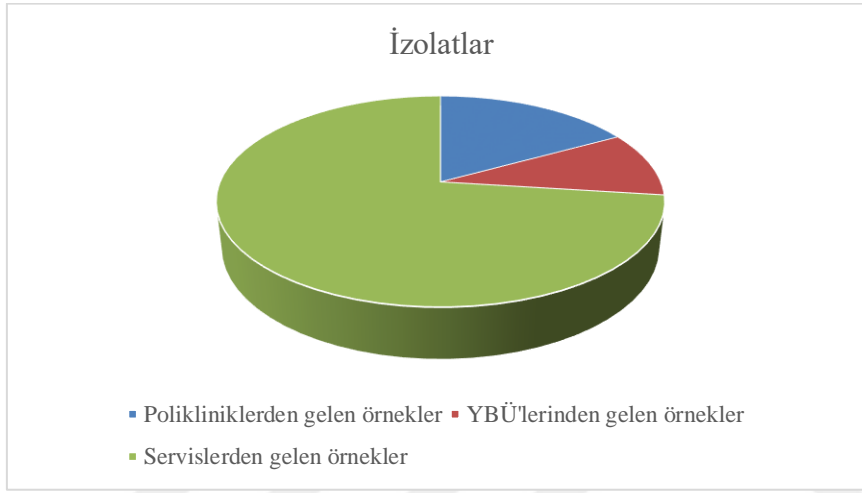
Hastalara ait klinik veriler incelendiğinde; hastaların 26'sında diyabet, 34'ünde hipertansiyon (HT), 23'ünde kardiyovasküler hastalık (KVH), 22'sinde kronik böbrek yetmezliği (KBY), 42'sinde malignite, 23'ünde pulmoner hastalık, 17'sinde serebrovasküler hastalık (SVO), 4'ünde karaciğer fonksiyon bozukluğu, 1'inde romatolojik hastalık mevcuttur. 17 hastada daha önce tanımlanan altta yatan başka bir hastalık belirlenmemiştir. Hastaların 32'sinde örnek gönderimi öncesi uzun süreli antibiyotik kullanımı mevcuttur. 24 hastanın ise yoğun bakım ünitesinde, örnek gönderim esnasında ya da yakın zamanlı bulunmuş olması dikkati çekmektedir.

Hasta örneklerinin 25'inde enterokok izolatlarına ek olarak farklı mikroorganizmalar izole edilmiştir. En sık *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli*

üremesi mevcut olup bunları *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus haemolyticus* ve *Staphylococcus epidermidis* takip etmiştir.

İzolatların 87 tanesi yatan hastaların, 13 tanesi ise poliklinik hastalarının örneklerinden izole edilmiştir. Yatan hastaların 10'u yoğun bakım ünitesinde (YBÜ), 77'si ise yoğun bakım ünitesi dışındaki birimlerde (6. Çizim).

#### 6. Çizim. İzolatların kliniklere göre dağılımı



Örneklerin gönderildiği kliniklerin 53'ü dahili servisler, 17'si cerrahi servisler, 7'si pediatri servisleri, 2'si dahili YBÜ, 2'si cerrahi YBÜ, 6'sı pediatri YBÜ, 3'ü dahili poliklinikler, 10'u ise acil servis olarak belirlenmiştir. Kliniklerden gönderilen örneklerin 71'ini idrar, 2'sini balgam, 17'sini yara, 3'ünü rektal sürüntü, 2'sini BOS, 1'ni dren sıvısı, 1'ini periton sıvısı ve 3'ünü apse oluşturmaktadır (12. Çizelge).

12. Çizelge. İzolatların örnek türü ve kliniklere göre dağılımı

Klinik	Örnek Türü								n %
	İdrar	Balgam	Yara	Periton Sıvısı	Rektal sürüntü	BOS	Apse	Dren sıvısı	
Dahili Servisler	44	1	6	-	1	-	1	-	53 (%53)
Cerrahi servisler	6	-	8	1	1	-	-	1	17 (%17)
Pediatri servisi	5	-	1	-	1	-	-	-	7 (%7)
Dahili YBÜ	-	1	-	-	-	1	-	-	2 (%2)
Cerrahi YBÜ	-	-	-	-	-	-	2	-	2 (%2)
Pediatri YBÜ	4	-	1	-	-	1	-	-	6 (%6)
Dahili Poliklinikler	3	-	-	-	-	-	-	-	3 (%3)
Acil	9	-	1	-	-	-	-	-	10 (%10)
<b>Toplam</b>	<b>71</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>100 (%100)</b>

Çalışmaya dahil edilen 100 enterokok suşunun 32'si *E. faecalis* 68'i *E. faecium* olarak tanımlanmıştır.

Hasta verileri incelendiğinde; 64 hastanın enfeksiyonu hastane kökenli, 36 hastanın enfeksiyonu toplum kökenli enfeksiyon olarak kabul edilmiştir. Hastane kökenli olarak değerlendirilen enterokok izolatlarının 11'i *E. faecalis*, 53'ü *E. faecium* iken toplum kökenli olarak değerlendirilen ise 21'i *E. faecalis*, 15'i *E. faecium* olarak tanımlanmıştır.

Enterokok türleri, izole edildiği hasta örneklerinin gönderildiği klinikler açısından karşılaştırıldığında YBÜ'nden gönderilen örneklerde; *E. faecium*, *E. faecalis*'e oranla, polikliniklerden gönderilen örneklerde ise *E. faecalis*, *E. faecium*'a oranla istatistiksel olarak daha fazla sayıda tanımlanmıştır ( $p=0,019$ ) (13. Çizelge).

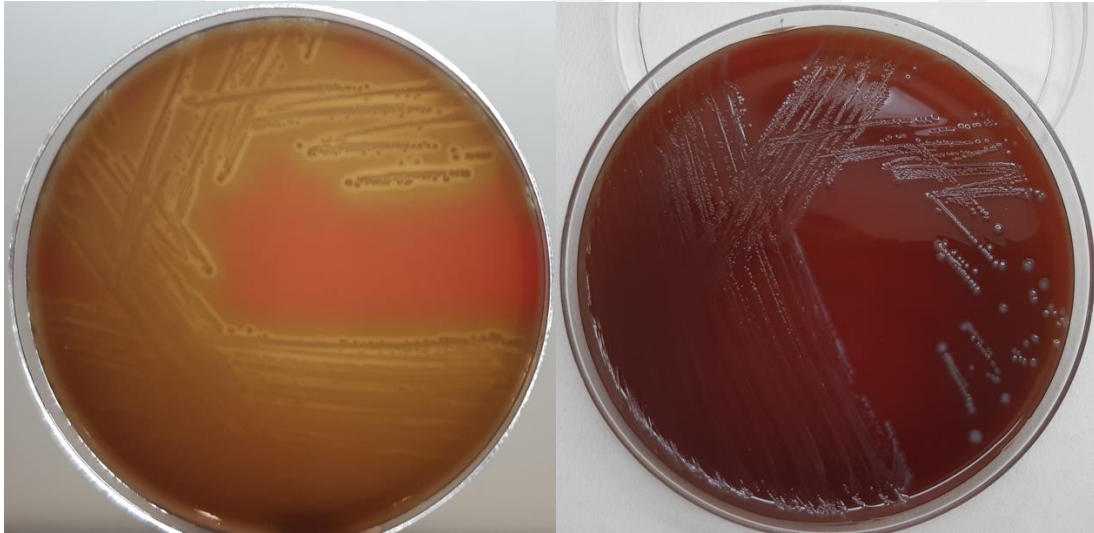
### 13. Çizelge. Enterokok türlerinin kliniklere göre dağılımı

<b>Klinik</b>	<b><i>E. faecalis</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>
Serviste yatan hastalar	23(%71,9)	54(%79,4)
YBÜ'nde yatan hastalar	1(%3,1)	9(%13,2)
Poliklinik	8(%25,0)	5(%7,4)

#### 4.2. İzolatların hemolizin üretimi

Enterokok izolatlarının hemolizin üretme özellikleri fenotipik olarak değerlendirildiğinde; %44'ünde hemolizin üretiminin izlendiği hemolizin üretimi pozitif izolatlarının çoğunluğunu *E. faecium*'un oluşturduğu görülmüştür. Hemolizin üretiminin değerlendirilmesinde pozitif ve negatif örnekler 7. Çizim'de gösterilmiştir.

#### 7. Çizim. Hemolizin üretiminin değerlendirilmesi



**A**

**B**

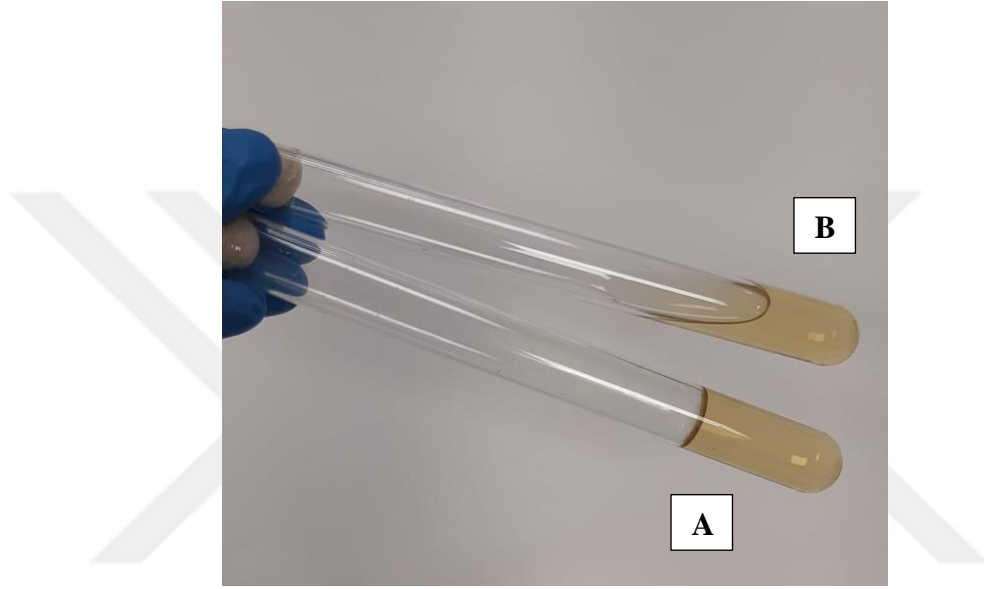
A;pozitif, B;negatif



### 4.3. İzolatların jelatinaz aktivitesi

Enterokok izolatlarının; jelatinaz aktivitesi incelendiğinde, izolatların %26'sında jelatinaz aktivitesi tespit edilmiştir. Jelatinaz aktivitesinin görüldüğü pozitif ve jelatinaz aktivitesinin izlenmediği negatif örnekler 8. Çizim'de gösterilmiştir.

#### 8. Çizim. Jelatinaz aktivitesinin değerlendirilmesi

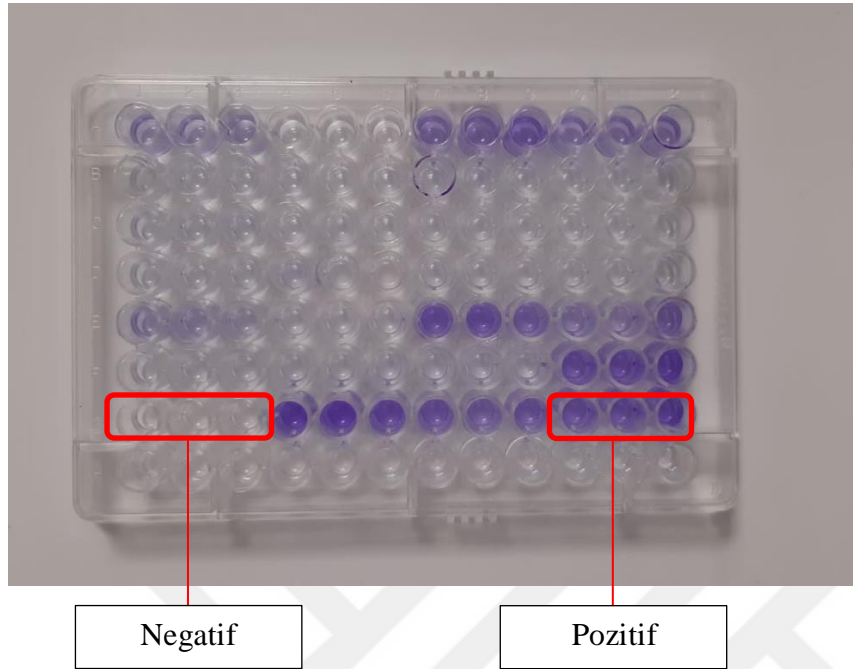


A; negatif, B; pozitif

### 4.4. İzolatların biyofilm üretimi

Enterokok izolatlarının; biyofilm üretme özellikleri değerlendirildiğinde, izolatların %19'unda biyofilm üretimi tespit edilmiştir. Biyofilm aktivitesi açısından kristal viyole ile boyanması sonrası mikroplak görünümü 9. Çizim'de gösterilmiştir.

9. Çizim. Biyofilm aktivitesi açısından kristal viyole ile boyanması sonrası mikroplak görünümü



İzolatların fenotipik özellikleri tür düzeyinde karşılaştırıldığında; *E. faecalis*'in biyofilm üretimi *E. faecium* 'a göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup hemolizin üretimi ve jelatinaz aktivitesinde türler arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmemiştir (14. Çizelge).

14. Çizelge. Enterokok izolatlarında hemolizin üretimi, jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretiminin dağılımı

Fenotipik Özellikler		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>p</i> değeri
Hemolizin üretimi	+	12 (%37,5)	32(%47,1)	0,495
	-	20(%62,5)	36(%52,9)	
Jelatinaz aktivitesi	+	11(%34,4)	15(%22,1)	0,287
	-	21(%65,6)	53(%77,9)	
Biyofilm üretimi	+	14(43,8%)	5(%7,4)	<0,001
	-	18(56,3%)	63(%92,6)	

#### 4.5. Antibiyotik duyarlılık sonuçları

Çalışmaya alınan enterokok izolatların en dirençli olduğu antimikrobiyal ajanlar siprofloksasin (%87) ve ampisilin (%69) olarak belirlenmiştir. Teikoplanin ve vankomisin için %16, tigesiklin için %18 oranında direnç saptanmıştır. Linezolid (%94) ise en duyarlı antibiyotik olarak belirlenmiştir. (15. Çizelge)

15. Çizelge. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Duyarlı (S)	Dirençli (R)	MİK50 (µg/ml)	MİK90 (µg/ml)	MİK Aralığı (µg/ml)
Ampisilin	%31	%69	>64	>64	1- >64
Siprofloksasin	%13	%87	>32	>32	0,12->32
Tigesiklin	%82	%18	0,06	1	0,06-4
Teikoplanin	%84	%16	<0,25	>64	<0,25->64
Vankomisin	%84	%16	<0,25	>64	<0,25->64
Linezolid	%94	%6	2	2	1-16

Enterokok izolatlarının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik MİK değerleri;

Ampisilin için; 30'u  $\leq 2$  µg/ml, 66'sı  $\geq 32$  µg/ml, 4'ü 2 µg/ml-32 µg/ml aralığında

Siprofloksasin için; 6'sı  $\leq 0,5$  µg/ml, 87'si  $\geq 8$  µg/ml, 7'si 0,5 µg/ml-8 µg/ml aralığında

Tigesiklin için 78'i  $\leq 0,12$  µg/ml, 8'i  $\geq 2$  µg/ml, 14'ü 0,12 µg/ml-2 µg/ml aralığında

Vankomisin için 58'i  $\leq 0,5$  µg/ml, 16'sı  $\geq 32$  µg/ml 26'sı 0,5 µg/ml-32 µg/ml aralığında

Teikoplanin için 84'ü  $\leq 0,5$  µg/ml, 16'sı  $\geq 32$  µg/ml

Linezolid için 6'sı  $\geq 8$  µg/ml, 94'ü  $\leq 4$  µg/ml olarak belirlenmiştir.

Enterokok türleri antibiyotik direnç oranları yönünden karşılaştırıldığında; *E. faecium* izolatlarının; ampisilin, teikoplanin ve vankomisin direnç oranı, *E. faecalis* izolatlarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Diğer antibiyotikler için izolatlar arasında istatistiksel açıdan belirgin fark izlenmemiştir (16. Çizelge).

16. Çizelge. *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

İzolat	Antimikrobiyal ajanlar											
	AMP		SİP		TG		TEİ		VAN		LNZ	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>E. faecalis</i>	29 (%93,5)	3 (%4,3)	7 (%53,8)	25 (%28,7)	29 (%35,4)	3 (%16,7)	31 (%36,9)	1 (%6,3)	31 (%36,9)	1 (%6,3)	30 (%31,9)	2 (%33,3)
<i>E. faecium</i>	2 (%6,5)	66 (%95,7)	6 (%46,2)	62 (%71,3)	53 (%64,6)	15 (%83,3)	53 (%63,1)	15 (%93,8)	53 (%63,1)	15 (%93,7)	64 (%68,1)	4 (%66,7)
<i>p</i>	<0,001		0,108		0,207		0,034		0,034		1,000	

S: Duyarlı R: Dirençli AMP: Ampisilin SİP: Siprofloksasin TG: Tigesiklin TEİ: Teikoplanin VAN: Vankomisin LNZ: Linezolid

Uzun süreli antibiyotik kullanımı ve YBÜ’nde örnek gönderim zamanı ya da yakın zamanlı bulunma ile enterokok türleri karşılaştırıldığında *E. faecium* ve *E. faecalis* izolatları arasında anlamlı fark izlenmemiştir ( $p=0,086$ ).

Uzun süreli antibiyotik kullanımı ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelendiğinde; uzun süreli antibiyotik kullanan hastalarda teikoplanin ve vankomisin direnci, kullanmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,002$ ) (17. Çizelge). YBÜ’nde örnek gönderim anı ya da yakın zamanlı bulunma durumu ile antibiyotik dirençleri arasında anlamlı bir ilişki izlenmemiştir.

17. Çizelge. Uzun süreli antibiyotik kullanımında antimikrobiyal direnç dağılımı

Uzun süreli ab kullanımı	Antimikrobiyal ajanlar											
	AMP		SİP		TG		TEİ		VAN		LNZ	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<b>pozitif</b>	7 (%25,8)	24 (%34,8)	6 (%46,2)	26 (%29,9)	25 (%30,5)	7 (%38,9)	21 (%25)	11 (%68,8)	21 (%25)	11 (%68,8)	32 (%34)	0 (%0)
<b>negatif</b>	23 (74,2)	45 (%65,2)	7 (%53,8)	61 (%70,1)	57 (%69,5)	11 (%61,1)	63 (%75)	5 (%31,3)	63 (%75)	5 (%31,3)	62 (%66)	6 (%100)
<i>p</i>	0,510		0,339		0,680		0,002		0,002		0,173	

ab: antibiyotik, S: Duyarlı, R: Dirençli, AMP: Ampisilin, SİP: Siprofloksasin, TG: Tigesiklin, TEİ: Teikoplanin, VAN: Vankomisin, LNZ: Linezolid

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları ile fenotipik özellikleri arasındaki ilişki 18. Çizelge’de gösterilmiştir.

18. Çizelge. İzolatların antimikrobiyal duyarlılığının hemolizin üretimi, jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretimi ile ilişkilendirilmesi

Antibiyotik		Hemolizin üretimi		Jelatinaz aktivitesi		Biyofilm üretimi	
		+	-	+	-	+	-
AMP	S	12(% 27,3)	19(% 33,9)	12(% 46,2)	19(% 25,7)	15(% 78,9)	16(% 19,8)
	R	32(% 72,7)	37(% 66,1)	14(% 53,8)	55(% 74,3)	4(% 21,1)	65(% 80,2)
	p	0,619		0,090		<0,001	
SİP	S	6(% 13,6)	7(% 12,5)	2(% 7,7)	11(% 14,9)	5(% 26,3)	8(% 9,9)
	R	38(% 86,4)	49(% 87,5)	24(% 92,3)	63(% 85,1)	14(% 73,7)	73(% 90,1)
	p	1,000		0,551		0,068	
TG	S	37(% 84,1)	45(% 80,4)	21(% 80,8)	61(% 82,4)	16(% 84,2)	66(% 81,5)
	R	7(% 15,9)	11(% 19,6)	5(% 19,2)	13(% 17,6)	3(% 15,8)	15(% 18,5)
	p	0,826		1,000		1,000	
TEİ	S	38(% 86,4)	46(% 82,1)	21(% 80,8)	63(% 85,1)	17(% 89,5)	67(% 82,7)
	R	6(% 13,6)	10(% 17,9)	5(% 19,2)	11(% 14,9)	2(% 10,5)	14(% 17,3)
	p	0,767		0,833		0,730	
VAN	S	38(% 86,4)	46(% 82,1)	21(% 80,8)	63(% 85,1)	17(% 89,5)	67(% 82,7)
	R	6(% 13,6)	10(% 17,9)	5(% 19,2)	11(% 14,9)	2(% 10,5)	14(% 17,3)
	p	0,767		0,833		0,730	
LNZ	S	41(% 93,2)	53(% 94,6)	25(% 96,2)	69(% 93,2)	19(% 100,0)	75(% 92,6)
	R	3(% 6,8)	3(% 5,4)	1(% 3,8)	5(% 6,8)	0(% 0)	6(% 7,4)
	p	1,000		1,000		0,592	

S: Duyarlı, R: Dirençli, AMP: Ampisilin, SİP: Siprofloksasin, TG: Tigesiklin, TEİ: Teikoplanin, VAN: Vankomisin, LNZ: Linezolid

Antimikrobiyal direnç durumları ile biyofilm üretimi karşılaştırıldığında ampisilin duyarlılığı, biyofilm üretimi saptanan izolatlarda istatistiksel açıdan daha yüksek bulunmuştur (<0,001). Değerlendirilen diğer antibiyotikler için anlamlı fark izlenmemiştir. Hemolizin üretimi ve jelatinaz aktivitesi ile antibiyotik direnci arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

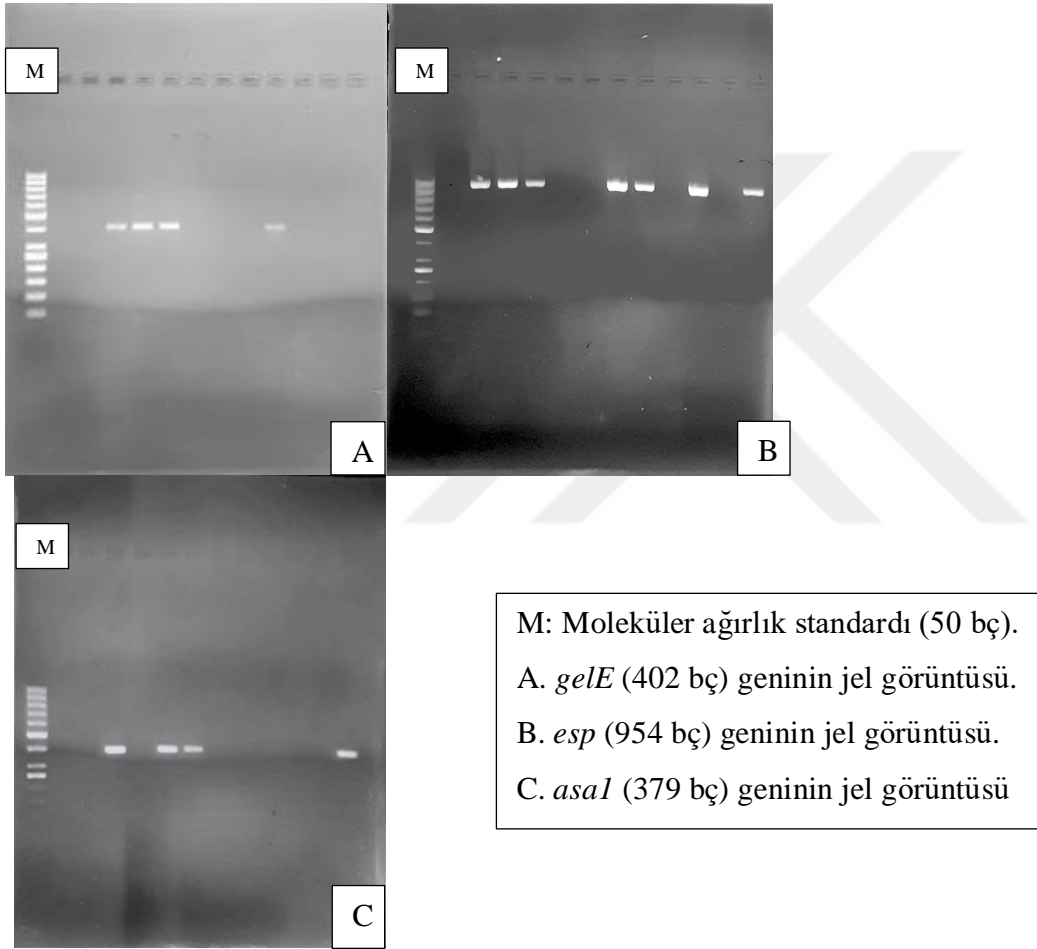
#### 4.6. PZR ile tespit edilen virülans genleri ve sıklığı

Çalışılan 100 yüksek düzey aminoglikozid dirençli izolatın virülans genleri varlığı PZR yöntemi ile incelendiğinde %14'ünde *gelE*, %23'ünde *asa1*, %19'unda ise *esp* pozitifliği izlenmiştir. *asa1* ve *gelE*'nin birlikte bulunma sıklığı %13, *gelE* ve *esp* %4, *asa1* ve *esp*

%11 olarak saptanmıştır. İzolatların %4'ünde virülans genlerinin üçü aynı anda bulunurken %68'inde araştırılan virülans gen bölgelerinden hiçbiri saptanmamıştır.

Virülans genlerini tespit etmek için yapılan PZR ve elektroforez sonrası jel görüntüleri örnekleri 10. Çizim'de gösterilmiştir.

10. Çizim. PZR ve elektroforez sonrası izolatlarda saptanan virülans genlerine ait jel görüntüleri



Enterokok türlerinde virülans gen bölgeleri varlığının sıklığı 19. Çizelge'de gösterilmiştir. *E. faecium* izolatlarıyla kıyaslandığında *E. faecalis* izolatlarında, *asaI*, *esp* ve *gelE* gen bölgeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır.

19. Çizelge. Enterokok türlerine göre virülans gen bölgelerinin sıklığı

Gen		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>p</i> değeri
<i>asa1</i>	+	19(%59,4)	4(%5,9)	<0,001
	-	13 (%40,6)	64 (%94,1)	
<i>esp</i>	+	14(%43,8)	5(%7,4)	<0,001
	-	18 (%56,3)	63(%92,6)	
<i>gelE</i>	+	11(%34,4)	3 (%4,4)	<0,001
	-	21 (%65,6)	65 (%95,6)	

Virülans genleri ile hastaların yaşları arasındaki ilişki incelendiğinde; *gelE* geni 17 yaş altındaki kişilerde istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır ( $p=0,023$ ). *asa1* ve *esp* için ise hasta yaşları arasında anlamlı bir fark belirlenmemiştir (20. Çizelge ). Cinsiyet ile virülans genleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

20. Çizelge. Enterokok türlerinde virülans genleri varlığının hastaların yaşlarına göre dağılımı

Gen		0-17 yaş	18-64yaş	≥65 yaş	<i>p</i> değeri
<i>asa1</i>	+	4(%28,6)	5(%13,2)	14(29,2)	0,208
	-	10(%71,4)	33(%86,8)	34(%70,8)	
<i>esp</i>	+	3(%21,4)	7(%18,4)	9(%18,8)	1,000
	-	11(%78,6)	31(%81,6)	39(%81,3)	
<i>gelE</i>	+	4(%28,6)	1(%2,6)	9(%18,8)	0,023
	-	10 (%71,4)	37(%97,4)	39(%81,3)	

Yatan hasta grubu ile ayaktan hasta grubu, bu hastalardan izole edilen enterokok türlerindeki virülans gen varlığı açısından karşılaştırıldığında; *asa1* ve *esp* geni ayaktan hasta grubundan izole edilen enterokok suşlarında, yatan hasta grubuna göre istatistiksel

olarak daha yüksek saptanmıştır. *gelE* geni için istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir (21.Çizelge).

21. Çizelge. Ayaktan hasta ile yatan hastalardan izole edilen enterokok türlerinin virülans gen varlığı yönünden karşılaştırılması

GEN		Ayaktan hasta	Yatan hasta	<i>p</i>
<i>asaI</i>	+	6(%50,0)	17(%19,3)	0,028
	-	6(%50,0)	71(%80,7)	
<i>gelE</i>	+	2(%16,7)	12(%13,6)	0,674
	-	10(%83,3)	76(%86,49)	
<i>esp</i>	+	6(%50,0)	13(%14,8)	0,010
	-	6(%50,0)	75(%85,2)	

Enterokok izolatlarının virülans gen bölgeleri varlığının, izolatın biyofilm ve hemolizin üretmesi ile ilişkisi incelenmiştir (22. Çizelge).

22. Çizelge. Biyofilm ve hemolizin üretme özellikleri ile *asaI*, *esp* ve *gelE* virülans gen bölgeleri varlığının ilişkisi

GEN		Biyofilm üretimi			Hemolizin üretimi		
		+	-	<i>p</i>	+	-	<i>p</i>
<i>asaI</i>	+	15(%78,9)	8(%9,9)	<0,001	4(%9,1)	19(%33,9)	0,007
	-	4(%21,1)	73(%90,1)		40(%90,9)	37(%66,1)	
<i>esp</i>	+	10(%52,6)	9(11,1)	<0,001	6(%13,6)	13(%23,2)	0,339
	-	9(%47,4)	72(%88,9)		38(%86,4)	43(%76,8)	
<i>gelE</i>	+	11(%57,9)	3(%3,7)	<0,001	0(%0)	14(%25)	<0,001
	-	8(%42,1)	78(%96,3)		44(%100)	42(%75)	



*asaI*, *esp* ve *gelE* virülans geni tespit edilen izolatlarda biyofilm üretimi istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır. İzolatların hemolizin üretimi açısından değerlendirildiğinde; *asaI* ve *gelE* gen bölgeleri varlığı hemolizin üretimi saptanmayan izolatlarda, hemolizin üretimi görülenlere göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmış olup *esp* gen bölgesi varlığı açısından anlamlı fark izlenmemiştir.

*gelE* genine sahip izolatlarda saptanan jelatinaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). *gelE* genine sahip 2 izolatta jelatinaz aktivitesi izlenmemiştir.

İzolatların antimikrobiyal duyarlılığının virülans gen bölgeleriyle ilişkisi 23. Çizelge’de gösterilmiştir.

23. Çizelge. Enterokok izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığının virülans gen bölgeleriyle ilişkisi

Virülans genleri	Antimikrobiyal ajanlar												
	AMP		SİP		TG		TEİ		VAN		LNZ		
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	
<i>asaI</i>	+	20 (%64,5)	3 (%4,3)	4 (%30,8)	19 (%21,8)	20 (%24,4)	3 (%16,7)	22 (%26,2)	1 (%6,3)	22 (%26,2)	1 (%6,3)	23 (%24,5)	- (%100)
	-	11 (%35,5)	66 (%95,7)	9 (%69,2)	68 (%78,2)	62 (%75,6)	15 (%83,3)	62 (%73,8)	15 (%93,8)	62 (%73,8)	15 (%93,8)	71 (%75,5)	6 (%100)
	<i>p</i>	<0,001		0,489		0,757		0,109		0,109		0,332	
<i>esp</i>	+	13 (%41,9)	6 (%8,7)	6 (%46,2)	13 (%14,9)	18 (%22)	1 (%5,6)	18 (%21,4)	1 (%6,2)	18 (%21,4)	1 (%6,2)	17 (%18,1)	2 (%33,3)
	-	18 (%58,1)	63 (%91,3)	7 (%53,8)	74 (%85,1)	64 (%78)	17 (%94,4)	66 (%78,6)	15 (93,8)	66 (%78,6)	15 (93,8)	77 (%81,9)	4 (%66,7)
	<i>p</i>	<0,001		0,016		0,183		0,294		0,294		0,319	
<i>gelE</i>	+	12 (%38,7)	2 (%2,9)	3 (%23,1)	11 (%12,6)	11 (%13,4)	3 (%16,7)	12 (%14,3)	2 (%12,5)	12 (%14,3)	2 (%12,5)	14 (%14,9)	0 (%0)
	-	19 (%61,3)	67 (%97,1)	10 (%76,9)	76 (%87,4)	71 (%86,6)	15 (%83,3)	72 (%85,7)	14 (%87,5)	72 (%85,7)	14 (%87,5)	80 (%85,1)	6 (%100)
	<i>p</i>	<0,001		0,386		0,713		1,000		1,000		0,591	

S: Duyarlı, R: Dirençli, AMP: Ampisilin, SİP: Siprofloksasin, TG: Tigesiklin, TEİ: Teikoplanin, VAN: Vankomisin, LNZ: Linezolid

*asaI* geni tespit edilen izolatlarda ampisilin direnç oranı bu genin saptanmadığı izolatlara göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır.

*esp* geni tespit edilen izolatlarda ampisilin ve siprofloksasin direnç oranı bu genin saptanmadığı izolatlara göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır.

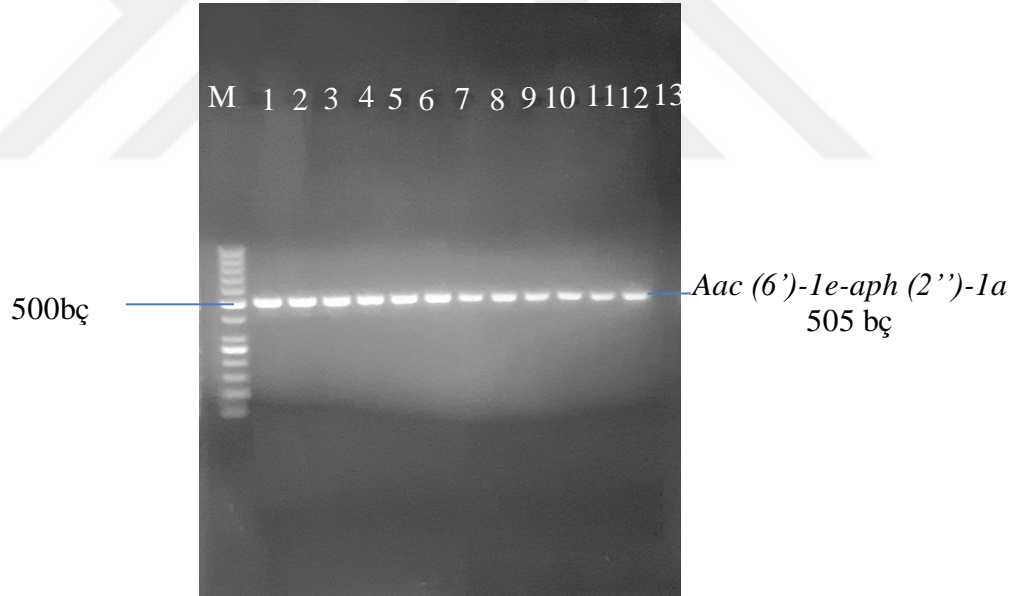
*gelE* geni tespit edilen izolatlarda ampisilin direnç oranı bu genin saptanmadığı izolatlara göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır.

Diğer antibiyotikler ile *asaI*, *esp* ve *gelE* gen bölgeleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki izlenmemiştir.

#### 4.7. PZR ile tespit edilen yüksek düzey aminoglikozid direnç genleri ve sıklığı

Çalışmaya alınan fenotipik olarak yüksek düzey aminoglikozid direnci tespit edilen 100 enterokok izolatında direnç genlerinin varlığı PZR yöntemi ile incelendiğinde; izolatların tümünde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* direnç geni tespit edilmiştir (11. Çizim). Araştırılan *Aph(2'')-Ib*, *Aph(2'')-Ic* ve *Aph(2'')-Id* direnç genleri hiçbir izolatta saptanmamıştır.

11. Çizim. PZR ve elektroforez sonrası izolatlarda saptanan *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* direnç genine ait jel görüntüsü



M: Moleküler ağırlık standardı (100 bç), 1 nolu kuyucuk: *E.faecalis* 'ATCC' 51299 suşu (Pozitif kontrol), 2-12 kuyucuklar: *Aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (+), 13 nolu kuyucuk negatif kontrol

## 5. TARTIŞMA

*Enterococcus* cinsi bakteriler, 1970'lerden bu yana ciddi bir nozokomiyal sorun haline gelmiştir. Plazmid veya transpozon aracılığıyla direnç ve virülans genlerini transfer etme yetenekleri, zorlu çevre şartlarına dayanıklılığı hastane patojenleri arasında üst sıralara yerleşmesini sağlamıştır. Enterokoklar, bir enfeksiyonun tek nedeni olarak doğrudan veya diğer mikroorganizmalarla koenfeksiyona katkıda bulunarak dolaylı yoldan enfeksiyonlara neden olabilmektedir.<sup>148</sup> Neden olduğu enfeksiyonların çoğu endojen olup çapraz enfeksiyon genellikle hastanede yatan hastalarda görülmektedir. Üriner sistem enfeksiyonları yara ve yumuşak doku enfeksiyonları, intraabdominal enfeksiyonlar, endokardit ve bakteriyemilerden izole edilen en sık fırsatçı patojenlerden biridir.

*E.faecalis*'den daha dirençli olan *E. faecium*'un, ABD'de çoklu ilaç dirençli enfeksiyonlarının önemli nedeni olduğu belirtilmiştir. Enterokoklar Amerika Birleşik Devletleri'nde hastane kaynaklı enfeksiyonun dördüncü, bakteriyeminin ise üçüncü önde gelen nedeni olarak gösterilmektedir.<sup>149</sup> 2019 yılı Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; EARSS) verilerine göre enfeksiyon etkeni olarak rapor edilen patojenlerin *E. faecalis* %6,8'ini, *E. faecium* ise %4,5'ini oluşturmaktadır. Weinstein ve ark.<sup>150</sup> kan dolaşımı enfeksiyonları üzerine yaptığı çalışmada, enterokokların yüksek ölüm riski ile bağımsız olarak ilişkilendirilen önemli gram pozitif bakteri olduğunu göstermişlerdir. Özellikle YDAD ve vankomisin dirençli suşların neden olduğu enterokok enfeksiyonları, hastanede kalış süresinin uzaması ve mortalite ile ilişkilendirilmiştir.

Üriner sistem enfeksiyonları enterokokların yol açtığı klinik hastalıkların en sık görülen tipidir. Bu nedenle klinik mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen enterokoklar en sık idrar örneklerinden izole edilmektedir.<sup>14,151</sup> Bizim çalışmamızda da enterokok türleri önceki çalışmalar ile benzer şekilde en fazla idrar örneklerinden izole edilmiştir. Enterokok kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının çoğunluğu nozokomiyal olup çoğunlukla üriner kateterizasyon ile birlikte görülmektedir.

Yapılan çalışmalar *E. faecalis*'in nozokomiyal enfeksiyonlarda en sık saptanan tür olduğunu belirtmektedir.<sup>152,153</sup> Ancak antibiyotik direnç artışının izlendiği son yıllarda *E. faecium* insidansında artış olduğu gözlenmektedir.<sup>10,151</sup> Çalışmamızda 100 enterokok suşunun 32'si *E. faecalis* iken 68'i *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Diğer enterokok

türleri çalışmamızda saptanmamıştır. Çalışmamızda *E. faecium* suşlarının daha fazla görülmesi; çalışmaya yüksek düzey aminoglikozid direnci bulunan enterokok türleri dahil edilmiş olması ve dirençli suşlarda *E. faecium* izolatlarının daha sık saptanmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Çoğu enfeksiyonun patogenezi, konakçı dokuların kolonizasyonu, invazyonu, dokunun istilası ve konağın savunma mekanizmalarına direnci içeren ortak bir olaylar dizisini takip eder. Virülans faktörlerinin yukarıda bahsedilen enfeksiyon aşamalarından bir veya daha fazlası ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Enterokoklarda antibiyotik direnç ve virülans genleri transpozon ve konjugasyon aracılığıyla aktarılmaktadır. Bakterilerde seks feromonlarının varlığı, yüzey adezyon proteinleri ile agregasyon faktörünün salınmasının bu genlerin aktarımını 1000 kat daha arttırdığı tespit edilmiştir. Leclercq ve ark.<sup>154</sup> seks feromonlarına sahip olan bakterilerin hemolizin aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca hemolizin üretimi enterokoklarda enfeksiyonun şiddetini artırmasından dolayı da virülansda büyük öneme sahiptir.<sup>80</sup> Huycke ve ark.<sup>155</sup> yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokoklarda hemolizin aktivitesini incelemişler ve 68 dirençli izolatın 62'sinde hemolizin aktivitesi tespit etmişlerdir. Hemolitik aktivite gösteren dirençli *E. faecalis* bakteriyemisi olan hastalarda hemolitik aktivite göstermeyen duyarlı suşları olan hastalara kıyasla bakteriyemiden sonraki 3 hafta içinde beş kat daha fazla ölüm görülmüştür.

Baylan ve ark.<sup>40</sup> çalışmalarında hemolizin üretimini %11,1 olarak belirtmiş olup tüm suşlar *E. faecalis* iken *E. faecium*'da hemolizin üretimi saptamamışlardır. Mete ve ark.<sup>139</sup>'nın çalışmasında ise hemolizin üretimini tüm suşlarda %38,4 saptarken *E. faecalis* izolatlarında %42,3, *E. faecium* izolatlarının ise %19,3 oranında tespit etmişlerdir. Kashef ve ark.<sup>156</sup>'nın 2017 yılında gerçekleştirdiği çalışmasında tüm izolatlarda %58, *E. faecalis* izolatlarının %68'inde, *E. faecium* izolatlarının ise %71'inde hemolizin aktivitesi gözlenmiştir. Çalışmamızda 100 enterokok izolatının 44'ünde hemolizin aktivitesi izlenmiş olup tür bazında değerlendirildiğinde *E. faecium* izolatlarının %47,1'inde *E. faecalis* izolatlarının ise %37,5'inde hemolizin üretimi belirlenmiştir. Hemolizin aktivitesi pozitifliği *E. faecium* izolatlarında *E. faecalis* izolatlarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber daha yüksek bulunmuştur. Hemolizin aktivitesi gösteren izolatların 4'te 1' YBÜ'nde yatan ya da yakın zamanlı bulunmuş olan hastalardan izole edilmiştir. Ayrıca

çalışmadaki ex olan hastaların örneklerinden izole edilen enterokokların 3'te 1'inin hemolizin aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular hemolizin aktivitesinin enterokokların virulansında önemli rol oynadığını göstermektedir.

Özellikle invazyon ve yayılma için önemli jelatinaz enzimi jelatin, kollajen, kazein, hemoglobin ve diğer peptitleri hidrolize edebilen bir proteazdır.

Comerlato ve ark.<sup>157</sup> çalışmalarında jelatinaz üretimini tüm izolatlarda %40, *E.faecalis* izolatlarında %63,3 ve *E.faecium*'da %5 oranında belirlemişlerdir. Soares ve ark.<sup>14</sup> 240 enterokok izolatında jelatinaz üretimini araştırmışlar ve tüm izolatlarda %31,2, tür bazında ise *E.faecalis* izolatlarında %33,5 ve *E.faecium*'da %5,3 oranında jelatinaz üretimi tespit etmişlerdir. Baylan ve ark.<sup>40</sup> 2011 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında *E.faecalis* izolatlarında %22 ve *E. faecium* izolatlarında %3,2 olmak üzere tüm izolatların %15,6'sında jelatinaz aktivitesi saptamışlardır. Bizim çalışmamızda tüm izolatların %26'sında tür bazında değerlendirildiğinde ise *E.faecalis* izolatlarında %34,4 ve *E.faecium* izolatlarında %22,1 oranında jelatinaz aktivitesi tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarla benzer şekilde *E.faecalis* izolatlarında *E.faecium* izolatlarına göre jelatinaz aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür.

Mevcut çalışma ayrıca enterokok izolatlarının biyofilm oluşturma kabiliyetini ve bunların virülans genleri ve antimikrobiyaller ile olası ilişkisini de tespit etmiştir.

Biyofilmin enfeksiyon bölgelerinde enterokokların kalıcılığını artırmada önemli rolü bulunmaktadır. Mikrobiyal biyofilmlerin doğada her yerde bulunduğu tespit edilmesi hastalık sürecinde biyofilm etkisinin araştırılmasını gerekli kılmıştır. Biyofilmler, mikroorganizmaların olumsuz koşullarda hayatta kalmalarını sağlayan hayati bir stratejidir. Donlan ve ark.<sup>96</sup> çalışmalarında tıbbi cihazların biyofilmleri barındırdığını ve bunun sonucunda cihazla ilişkili enfeksiyonların yüksek oranda biyofilm ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Enterokokların neden olduğu periodontitis, kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonları, endokardit gibi enfeksiyonların patogenizinde biyofilmin önemli rolü bulunmaktadır.

Komiyama ve ark.<sup>158</sup>'nin 2016 yılındaki çalışmalarında 240 bireyden alınan oral örneklerin 40'ında enterokok üremesi saptanmış ve enterokokların tümünde biyofilm oluşumu izlenmiştir. Suşların %38'inin hemoliz özelliği olduğu ve %39'unun jelatinaz aktivitesi bulunduğu bildirilmiştir.

*gelE*, *esp* ve *asaI* yapılan çalışmalarda enteroklarda biyofilm ile ilişkilendirilmiş en önemli virülans genleridir.

Golob ve ark.<sup>159</sup> 2019 yılında yaptığı bir çalışmada enterokok yüzey proteininin insanlarda idrar yolu enfeksiyonlarında, biyofilm üretiminde ve kolonizasyonunda önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir. Toledo-Arana ve ark.<sup>160</sup> *E. faecalis esp* pozitif izolatlarının %93,5'inin abiyotik bir yüzey üzerinde biyofilm oluşturduğunu ve *esp* negatif *E. faecalis* izolatlarının hiçbirinin biyofilm üretmediğini bildirmiştir. Bu bulgular ile *esp*'nin *E. faecalis*'in biyofilm oluşum sürecinde önemli rolü olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da *esp* pozitif izolatların %52,6'sında biyofilm üretimi olduğu tespit edilmiştir.

Latasa ve ark.<sup>73</sup> çalışmalarında *esp* geninde mutasyon sonucunda *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma yeteneğini de kaybettiği ardından *esp* negatif *E. faecalis* izolatlarının, *esp* genini plazmid transferi ile aldıktan sonra tekrar biyofilm ürettiğini göstermişlerdir.

Soares ve ark.<sup>14</sup>'nın çalışmasında *agg*, *esp* ve *gelE* virülans genlerinin tümünün biyofilm üretimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Biyofilm aktivitesi gözlenen izolatlarda en yüksek antimikrobiyal direnç siprofloksasin ve yüksek düzey gentamisinde izlenmiştir. Linezolid, ampisilin ve vankomisin için ise anlamlı bir ilişki izlenmemiştir. *E. faecalis* izolatlarında *E. faecium* izolatlarına oranla daha yüksek biyofilm aktivitesi izlenmiştir.

Dupre ve ark.<sup>161</sup> çalışmasında biyofilm aktivitesini sadece *E. faecalis* izolatlarında tespit etmiş ve *esp* varlığının biyofilm üretimindeki önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca biyofilm aktivitesi gösteren enterokok suşlarında daha fazla ampisilin direncinin izlendiğini vurgulamışlardır. Shahi ve ark.<sup>151</sup> yaptığı çalışmada da benzer şekilde *esp* gen pozitifliği ve biyofilm oluşumu arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür.

Almohamad ve ark.<sup>162</sup>'nin çalışmasında klinik izolatlar ile toplumdaki hasta olmayan bireylerin dışkısından izole edilen izolatlar biyofilm üretimi açısından karşılaştırılmış ve klinik izolarda biyofilm oluşumunun çok daha yüksek sayıda olduğu görülmüştür. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı şekilde biyofilm üretimi ile virülans genleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Di Rosa ve ark.<sup>163</sup> çalışmasında da benzer şekilde biyofilm ile jelatinaz aktivitesi ve *esp* gen varlığı açısından anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Kashef ve ark.<sup>156</sup>'nın çalışmasında %76 *E. faecalis*, %24 ise *E. faecium* izolatları olmak üzere tüm izolatların %75'inde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *esp* geni pozitif olan enterokok izolatlarında %92 oranında biyofilm aktivitesi saptanmıştır. Benzer şekilde *gelE* geni pozitif olan izolatların %87'sinin biyofilm oluşturduğu görülmüş ve *gelE* geni pozitif olanlarda negatif olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla biyofilm üretimi tespit edilmiştir.

Antibiyotiklere biyofilm direncini belirleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Hücre dışı matrisin, antibiyotiklerin matris içinde yer alan hücrelere nüfuz etmesini ve erişmesini önleyen fiziksel veya kimyasal bir bariyer sağladığı öne sürülmüştür.<sup>164</sup>

Bizim çalışmamızda *E. faecalis* izolatlarının %43,8'inde, *E. faecium* izolatlarının %7,4'ünde, tüm izolatların ise %19'unda biyofilm aktivitesi tespit edilmiş olup önceki çoğu çalışma ile benzer şekilde *E. faecalis*'in *E. faecium*'dan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek oranda biyofilm ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca yine çalışmaların çoğu ile benzer şekilde *asaI*, *esp* ve *gelE* virülans geni tespit edilen izolatlarda biyofilm üretimi istatistiksel olarak daha yüksek saptanmıştır. Antimikrobiyal direnç durumları ile biyofilm üretimi karşılaştırıldığında ise ampisilin direnci, biyofilm aktivitesi saptanan izolatlarda istatistiksel açıdan daha düşük tespit edilmiştir.

Enterokoklar özellikle YDAD ve vankomisin direnci ile nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde sorunlara neden olmaktadır. İntrinsik ve ekstrinsik antibiyotik direnç mekanizmaları aracılığıyla, konak bağışıklık yanıtından kaçmakta ve konak savunma mekanizmalarını önlemektedir.

Ampisilin enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde direnç izlenmediği durumlarda öncelikle tercih edilmesi gereken antimikrobiyal ajanlardan birisidir ancak artan direnç oranı nedeniyle ampirik tedavi uygulamalarında tedavi başarısızlıkları izlenebilmektedir. Esen ve ark.<sup>165</sup>, 2001 yılında yaptıkları çalışmada enterokok türlerinde ampisilin direncini %33 oranında saptamışlardır. Meriç ve ark.<sup>166</sup>'nın 2004 yılında yaptıkları çalışmada *E. faecalis* izolatlarında %4, *E. faecium* izolatlarında % 78 ; Kaçmaz ve ark.<sup>167</sup>'nin 2004 yılında yaptıkları çalışmasında *E. faecalis* izolatlarında %11, *E. faecium* izolatlarında ise %77 olarak ampisilin direncini tespit etmişlerdir. Dinç ve ark.<sup>168</sup>'nin 2009 yılında yaptığı çalışmada enterokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde önemli bir seçenek olan ampisiline direnç *E. faecalis* suşlarında %3, *E. faecium* suşlarında ise % 89 oranında

bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterokokların giderek arttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda ampisilin direnci %69 oranında görülmüştür. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde *E.faecalis* suşlarında direnç %4,3 iken *E.faecium* suşlarında %95,7 oranında saptanmıştır. Diğer çalışmalar ile benzer şekilde *E.faecium* suşlarında istatistiksel açıdan ampisilin direnci *E. faecalis* izolatlarına göre daha yüksek izlenmiştir. *E. faecium*, β-laktam antibiyotiklere *E. faecalis*'e göre daha az duyarlıdır çünkü penisilin bağlayıcı proteinleri β-laktam antibiyotiklere karşı belirgin şekilde daha düşük afiniteye sahiptir.<sup>169</sup>

Florokinolonlar, gram pozitif ve gram negatif bakteriler için geniş bir spektruma sahiptir. Ayrıca oral alınabilmesi ve yan etkilerinin az olması nedeniyle ampirik tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır. Siprofloksasinin toplumda ve hastanelerde sık kullanılmasının sonucunda kinolon direnç oranlarının yüksek tespit edildiği düşünülmektedir. Ülkemizde Özseven ve ark.<sup>170</sup>'nin yaptığı çalışmada siprofloksasin direnci *E.faecalis* ve *E.faecium* için sırasıyla %72 ve %92 olduğu saptanmıştır. Iraz ve ark.<sup>171</sup>'nin çalışmasında *E.faecalis* için % 47, *E.faecium* için % 84 oranında siprofloksasin direnci izlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise diğer çalışmalar ile benzer şekilde siprofloksasin direnci %87 oranında saptanmış olup duyarlılıkları incelenen antimikrobiyaller arasında en fazla direnç izlenen antibiyotiktir. Çalışmamıza YDAD'li enterokokların dahil edilmiş olması ve aminoglikozid direnci ile siprofloksasin direncinin birlikte görülmesinin sık olması nedeniyle siprofloksasin direncinin bu denli yüksek olduğu düşünülmektedir. Enterokok türleri incelendiğinde *E.faecalis* suşlarında %28,7, *E.faecium* suşlarında ise %71,3 oranında siprofloksasin direnci saptanmıştır. *E. faecium*'da doğal ve kazanılmış direncin *E. faecalis*'e göre daha sık gözlenmesine bağlı olarak siprofloksasin direncinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Tigesiklin polimikrobiyal infeksiyonlarda tercih edilebilecek geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Çalışmaların çoğu <%1 tigesiklin direnci bildirmiştir. Rathe ve ark.<sup>172</sup>'nin çalışmasında vankomisin direnci bulunan enterokok suşlarının tümünü tigesiklin için duyarlı olarak saptamışlardır. Benzer şekilde Manoharan ve ark.<sup>173</sup>'nin çalışmasında 63'ünde vankomisin direnci saptanan 100 enterokok suşunun tümü tigesikline duyarlı bulunmuştur. Dadashi ve ark.<sup>174</sup>'nin 2010-2020 yılları arasındaki araştırma makalelerini inceleyerek gerçekleştirdikleri çalışmada, tigesikline dirençli *E. faecium* (%1) suşlarının prevalansını *E. faecalis* suşlarından (%0,3) daha yüksek saptamışlardır. Kıtalar arasında



tigesiklin direnç oranını en yüksek Avrupa’da *E. faecium* (%3,9) izolatlarında belirlerken Asya ve Amerika’da sırasıyla *E. faecium* direnç oranlarını %1,3 ve %0,3 olarak tespit etmişlerdir. *E. faecalis* için direnç oranları çok daha düşük izlenmiştir. Bizim çalışmamızda 100 enterokok izolatınının 3’ü *E. faecalis*’te ve 15’i *E. faecium* izolatları olmak üzere toplam 18 izolatta tigesiklin direnci izlenmiştir. Türler arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark izlenmemiş olup *E. faecium* suşlarında görece fazla olarak tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tigesikline dirençli enterokokların ortaya çıkışının arttığı bildirilmektedir<sup>175</sup>. Çalışmamızda tigesiklin direncinin diğer çalışmalara göre daha fazla görülmesinin nedeninin uygunsuz ve uzun süreli antibiyotik kullanımı olduğu düşünülmüştür.

Enterokoklarda glikopeptid grubu antibiyotiklere direnç ilk olarak 1988’de Uttley ve ark.<sup>176</sup> tarafından bildirilmiş ardından vankomisine ve teikoplanine dirençli suşlar tüm dünyada yayılmıştır. Türkiye’de ise ilk kez 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde bir hastadan izole edilmiştir.<sup>177</sup> Centers for disease Control and Prevention (CDC) verilerine göre *E. faecalis*’te vankomisin direnci %4,2 iken *E. faecium*’da %65,1 saptanmıştır. Dünyada vankomisin dirençli enterokok oranları Kuzey Amerika’da en yüksektir. Avrupa’da VRE oranı artmakla beraber daha az görülmektedir. Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; EARSS) 2019 raporunda; Avrupa’da vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarının yüzdesinin 2015’te %10,5’ten 2019’da %18,3’e yükseldiği bildirilmiştir. Avrupa’nın kuzeyindeki ülkelerden; daha düşük direnç yüzdeleri, Avrupa’nın güneyi ve doğusundaki ülkelerden ise daha yüksek direnç yüzdeleri rapor edilmiştir. Ülkemizde Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı 2019 özet raporunda *E. faecium* direnç oranı %18,9 iken *E. faecalis* izolatlarında %3,8 olarak belirtilmiştir.

Brezilya’da yapılan bir araştırmada 81 fekal örnekten 37’sinde vankomisin direnci saptanmış olup %54,1’i *E. faecium*, %45,9’u *E. faecalis* suşlarında olduğu görülmüştür.<sup>178</sup> Türkiye’de 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada idrar örneklerinden izole edilen 536 enterokok suşunun 79’unda (%14,7) vankomisin direnci tespit edilmiştir. Vankomisine dirençli olan izolatların 77’sinin *E. faecium* diğer 2 izolatın ise *E. gallinarum* olduğu görülmüş, *E. faecalis* izolatlarında ise vankomisin direnci saptanmamıştır.<sup>179</sup> Bizim çalışmamızda 100 enterokok izolatınının 16’sında vankomisin ve teikoplanin direnci

saptanmıştır. Vankomisin ve teikoplanin dirençli 16 izolatın 15'i *E. faecium* iken sadece 1 izolat *E. faecalis* olarak saptanmıştır. *E. faecium* izolatlarının; teikoplanin ve vankomisin direnç oranı diğer çalışmalar ile benzer olarak, *E. faecalis* izolatlarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.

Araştırmalar hastanede yatan ve uzun süre antibiyotik tedavisi almış kişilerin, VRE enfeksiyonu gelişmesi açısından risk altında olduğunu belirtmektedir.<sup>180,181</sup> Çalışmamızda uzun süreli antibiyotik kullanan hastalarda teikoplanin ve vankomisin direncinin, kullanmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanması bu tezi doğrular niteliktedir.

Amerika'da yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinde 4 yılda VRE oranında 34 kat artış olduğu saptanmıştır.<sup>181</sup> Bizim çalışmamızda da örnek gönderim anı ya da yakın zamanlı YBÜ'nde yatışı olan hastaların örneklerinden izole edilen 24 enterokok izolatının 6'sında vankomisin ve teikoplanin direnci saptanmıştır.

Linezolid, çoklu ilaca dirençli Gram pozitif organizmaların neden olduğu ciddi enfeksiyonlar için büyük terapötik etkinliğe sahiptir.<sup>182,183</sup> Dadashi ve ark.<sup>174</sup>'nın çalışmasında Asya, Avrupa ve Amerika'da linezolid dirençli *E. faecalis* izolatlarının prevalansı sırasıyla %2,8, %2,1 ve %0,7; *E. faecium* için ise Asya, Avrupa ve Amerika'daki prevalans sırasıyla %0,9, %1,8 ve %3,4 olarak tespit edilmiştir. Kıtalar arası incelendiğinde *E. faecalis* için en düşük direnç Amerika'da olduğu görülürken *E. faecium* direnci en yüksek %13,9 ile Afrika'da görülmüştür. Aynı çalışmada Türkiye için *E. faecalis*'te direnç %7,1 olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda linezolid direnci %6 oranında görülmüştür. Türler arasında değerlendirildiğinde 4 *E. faecium* ve 2 *E. faecalis* izolatında saptanmış olup istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. Linezolid, dirençli Gram pozitif kokların neden olduğu enfeksiyonlar için terapötik bir ajan olarak 2000 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Ne yazık ki, bu antibiyotiğin son 20 yılda yaygın kullanımı, 2001 yılında linezolid dirençli VRE'nin ortaya çıkmasına ve bu suşların özellikle hastanelerde artmasına neden olmuştur.<sup>184</sup>

Enterokok izolatlarında *asa1*, *esp* ve *gelE* gibi virülans faktörü genleri belirlenmiş olup birçok insan ve hayvan çalışmalarında etkileri gösterilmiştir.

*asa1* geni sistemik enfeksiyonların gelişmesini kolaylaştıran bakterilerin ökaryot yüzeylere bağlanmasına izin veren bir virülans faktörüdür. Hallgren ve ark.<sup>185</sup>'nin

çalışmasında 94 *E.faecalis* izolatının %79'unda *asaI* genini tespit etmişlerdir. Arshadi ve ark.<sup>186</sup>'nın çalışmasında *asaI* geninin *E. faecalis*'te *E. faecium*'a kıyasla daha yüksek oranda saptamışlardır. Baylan ve ark.<sup>40</sup>'nın çalışmasında *asaI* gen pozitifliği *E.faecalis* izolatlarında %40,7 olarak saptanırken *E.faecium* izolatlarında tespit edilmemiştir. Mete ve ark.<sup>139</sup>'nın 2017 yılında yaptıkları çalışmada ise *asaI* genini *E.faecalis* izolatlarında %58, *E.faecium* izolatlarında %25,3 olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda %23 oranında *asaI* geni tespit edilmiş olup *asaI* gen pozitifliğinin çoğunluğunu diğer çalışmalar ile benzer şekilde *E.faecalis* izolatları oluşturmaktadır.

Chow ve ark.<sup>187</sup>'nin tavşan endokardit modelinde yaptıkları çalışmada hemolizin üretimi ile agregasyon maddesi birlikteliğinin artan ölüm oranı ve vejetasyon miktarının agregasyon maddesi üretimi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda hemolizin üretimi saptanmayan izolatlarda *asaI* pozitifliği istatistiksel olarak daha fazla izlenmiştir.

Esp konak dokulara yapışma ve immün yanıtta kaçışta rol alan önemli virülans faktörlerindedir. Esp'nin özellikle üriner sistem kolonizasyonunda ve kalıcılığında rolü vardır. Jovanovic ve ark.<sup>188</sup>'nin hematoloji hasta grubunda gerçekleştirdiği çalışmalarında orofaringeal ve dışkı örneklerindeki VRE izolatlarını *esp* gen taşıyıcılığı açısından karşılaştırmış ve orofaringeal bölgede anlamlı derecede yüksek saptamıştır. Vergis ve ark.<sup>189</sup> çalışmalarında *esp* üretiminin mesanede *E. faecalis*'in kalıcılığını arttırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar *esp* geninin kolonizasyon ve kalıcılıkta önemli virülans faktörü olduğunu desteklemektedir. *esp* geni özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde tespit edilmiştir. Enterokokal izolatlarda *esp* ekspresyon oranı Asya ülkelerinde %49,5- %77, Avrupa ülkelerinde %33-65 ve Amerika'da ise %33-76 oranlarında izlenmektedir.<sup>15,190-193</sup> Türkiye'de Çopur ve ark.<sup>194</sup> tarafından yapılan bir araştırmada enterokoklarda %78,4 oranında *esp* gen varlığı tespit etmişler ve *esp*'nin çalışmalarında en fazla izlenen virülans geni olduğunu bildirmişlerdir. 2011 yılında Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada ise tüm enterokokların %25,6'sında tür bazında değerlendirildiğinde *E. faecalis*'in %35,6 *E. faecium* için %6,5 oranında *esp* gen varlığı saptanmıştır.<sup>40</sup> Bizim çalışmamızda tüm enterokokların %19'unda, *E. faecalis*'te %43,8, *E. faecium*'da %7,4 oranlarında *esp* geni tespit edilmiş olup önceki çalışmalar ile benzer şekilde *E. faecalis* izolatlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Baylan ve ark.<sup>40</sup> *esp* ve *asaI* genlerini sırasıyla %25,6 ve %26,7 oranlarında en yaygın rastlanan genler olarak tespit etmişlerdir. Bu bulgularla uyumlu olarak çalışmamızda *asaI* ve *esp* genleri en sık tespit edilen virülans genleridir.

*gelE* virülans geni jelatinaz enziminin üretilmesinde görev almaktadır. Sharifi ve ark.<sup>195</sup> idrar yolu enfeksiyonu bulunan hastaların örneklerinden izole ettikleri enterokoklarda virülans faktörlerini araştırmışlar ve *E. faecalis* izolatlarında İYE ile *gelE* gen varlığı arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda *gelE* gen varlığı prevalansı kıtalar arasında incelendiğinde Asya'da %27-65,9, Amerika'da %60 ve Avrupa'da %74,3 oranlarında belirlenmiştir.<sup>157,190,196-198</sup>. Zou ve ark.<sup>199</sup>'nın Çin'de gerçekleştirdikleri çalışmalarında 107 *E. faecalis* izolatının %69,3'ünde *gelE* genini tespit etmişlerdir. Comerlato ve ark.<sup>157</sup>'nin 50 enterokok izolatı ile yaptıkları bir çalışmada *gelE*'yi %60 oranında pozitif saptamışlardır. 2015 yılında Talib ve ark.<sup>200</sup>'nin çalışmasında ise 222 enterokok izolatında %74,7 oranında *gelE* gen varlığı bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da *E. faecalis* izolatlarında daha yüksek oranda olduğu belirtilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise Çopur ve ark.<sup>194</sup>'ları %12,9, Mete ve ark.<sup>139</sup> ise %7,9 oranında *gelE* gen varlığını tespit etmişlerdir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda *gelE* geninin diğer ülkelere oranla daha az saptandığı dikkati çekmektedir. Bizim çalışmamızda da %14 oran ile en az saptanan virülans geni *gelE*'dir. *E. faecalis* suşlarının %34,4'ünde, *E. faecium* suşlarının ise %4,4'ünde izlenmektedir. Diğer çalışmalar ile benzer şekilde *E. faecalis* suşlarında *E. faecium*'a oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda *gelE* genine sahip 2 izolatta jelatinaz aktivitesi izlenmemiştir. Lindenstrau ve ark.<sup>201</sup> genotipik olarak *gelE* geni varlığı saptanan izolatlarda *gelE* geninin veya *gelE* geninin ekspresyonu düzenleyen genlerden birinin mutasyonu nedeniyle jelatinaz özelliğinin ifade edilemeyeceğini belirtmişlerdir. Comerlato ve ark.<sup>157</sup>'nin çalışmasında 30 *gelE* geni tespit edilen enterokok izolatının 10'unda jelatinaz aktivitesinin izlenmediği görülmüştür. Qin ve ark.<sup>86</sup>'nin çalışmasında ise *E. faecalis* izolatlarında *gelE* geni varlığı saptanan izolatların yalnızca %60'ında jelatinaz üretimini tespit etmişlerdir.

Sharifi ve ark.<sup>196</sup>'nin çalışmasında hastanede yatan hastalarda, ayaktan hastalara göre *gelE*-pozitif enterokok izolatları daha az sıklıkta bulunmuştur. Çalışmamızda da *asaI* ve *esp* geni yatan hasta grubundan izole edilen enterokok suşlarında, hastanede yatışı olmayan hastalardan izole edilen enterokok suşlarına oranla istatistiksel olarak daha düşük

saptanmıştır. *asaI* ve *esp* geninin yatan hastalarda daha düşük saptanmasının nedeninin virülans faktörlerinin *E. faecalis* izolatlarında daha fazla saptanması, *E. faecalis* izolatlarının da hastanede yatan hastalarda daha az sıklıkta görülmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Virülans faktörleri varlığı ile antibiyotik direncinin ilişkisi değerlendirildiğinde; Baylan ve ark.<sup>40</sup>'nın çalışmasında *asaI* geni pozitif *E. faecalis* izolatlarının siprofloksasin'e *asaI* geni içermeyen izolatlara göre anlamlı düzeyde daha dirençli oldukları saptanmıştır. Ampisilin, gentamisin ve vankomisinde anlamlı fark tespit etmemişlerdir.

Billström ve ark.<sup>15</sup> idrar yolu enfeksiyonu bulunan hastaların örneklerinden izole ettikleri *E. faecium* izolatlarında virülans faktörleri ile antimikrobiyal duyarlılığı karşılaştırmışlar ve *esp* geni pozitif olan izolatların çoğunda ampisilin ve siprofloksasin direncinin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Diğer virülans genleri ile antimikrobiyal duyarlılık arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Sharifi ve ark.<sup>195</sup>'nin çalışmasında ise idrar örneklerinden elde edilen *esp* pozitif *E. faecium* suşlarında ampisilin (%97) ve siprofloksasin (%100)'e karşı yüksek oranda direnç izlenmiştir. Direnç oranının diğer türlere göre daha fazla görüldüğü *E. faecium* suşlarının çalışmalara dahil edilmesinin, bu çalışmalarda antimikrobiyal direncinin yüksek olmasının nedenlerinden biri olarak düşünülmüştür.

Vergis ve ark.<sup>189</sup>'nin 219 *E. faecalis* izolatında yaptıkları çalışmada diğerlerinden farklı olarak, hemolizin, jelatinaz üretimi ve *esp* geninin varlığı ile ampisilin, gentamisin ve vankomisin direnci arasında ilişki saptamamışlardır. Ayrıca izlenen 14 gün içindeki mortalite ile virülans genleri arasında da anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.

2019 yılında Coşkun ve ark.<sup>10</sup>'nın gerçekleştirdikleri çalışmada, ampisilin direncini *gelE* pozitif *E. faecalis* izolatlarında *gelE* negatif *E. faecalis* izolatlarına göre daha yüksek saptamışlardır. Siprofloksasin direnci ise *gelE* negatif *E. faecalis* izolatlarında *gelE* pozitif *E. faecalis*'e oranla daha yüksek belirlenmiştir. *esp* negatif *E. faecium* izolatlarında siprofloksasin direnci *esp* pozitif *E. faecium*'a oranla daha yüksek izlenmiştir. *asaI* ve *gelE* pozitif *E. faecium* izolatları, bu genlere sahip olmayan izolatlara göre teikoplanine daha duyarlı olarak belirlenmiştir. *asaI* ve *gelE* pozitif *E. faecalis* izolatları, vankomisine bu genlerin izlenmediği *E. faecalis* izolatlarına göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Linezolid direnci ile virülans genleri arasında ilişki saptanmamıştır.

Baysal ve ark.<sup>68</sup>'nin 2019 yılında gerçekleştirdiği çalışmalarında *asaI*, *esp* ve *gelE* geni açısından pozitif olan izolatların söz konusu genleri taşımayan izolatlara göre ampisilin ve siprofloksasine direnç oranı daha düşük tespit edilmiştir. *gelE* geni açısından pozitif olan izolatların ayrıca gentamisin ve streptomisine direnç oranı daha düşük bulunmuştur. Diğer gen bölgeleri ve antibiyotik dirençleri arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Bizim çalışmamızda ise Baysal ve ark.<sup>68</sup>'nin çalışmasına benzer şekilde *asaI*, *esp* ve *gelE* geni tespit edilen izolatlarda ampisilin direnç oranı bu gene sahip olmayan izolatlara göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır. Ayrıca *esp* geni tespit edilen izolatlarda siprofloksasin direnç oranı bu genin saptanmadığı izolatlara göre daha düşük izlenmiştir. Diğer antibiyotikler ile *asaI*, *esp* ve *gelE* gen bölgeleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki izlenmemiştir.

Bakterilerin olumsuz koşullar altında hayatta kalabilmesinde hem virülans faktörlerinin hem de antimikrobiyal direnç mekanizmalarının önemli rolü vardır. Konak savunma sistemlerinin üstesinden gelmek için virülans mekanizmaları gereklidir ancak bakterilerin antimikrobiyal tedavilerin üstesinden gelmesi, zorlu ortamlara uyum sağlaması ve hayatta kalmasını sağlamak için antimikrobiyal direncin geliştirilmesi de önem arz etmektedir. Artan antibiyotik direnci her zaman virülans faktörlerindeki artışla ilişkili değildir. Beceiro ve ark.<sup>202</sup> araştırmasında artan antimikrobiyal direncin, çoğu durumda, doğrudan veya dolaylı olarak, azalan virülans ile ilişkilendirmiştir. Düşük virülans ve yüksek direnç ya da yüksek virülans ve düşük direnç durumlarının görülebileceği, yüksek virülans ve düşük direnç durumunda dengenin sağlanması için telafi edici mutasyonların ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir. Bu ilişkinin araştırılması ve daha derinlemesine çalışmaların yapılması gerekliliğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda da *E. faecium* izolatlarında antimikrobiyal direnç *E. faecalis* izolatlarına oranla daha fazla görülmüştür. Virülans genlerinin varlığı ve biyofilm aktivitesi ise *E. faecalis* izolatlarında *E. faecium* izolatlarına göre daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Antibiyotik direnci virülansta önemli bir faktördür ancak virülans genlerinin ve biyofilm üretiminin daha yüksek oranda izlendiği *E. faecalis*'in de ciddi enfeksiyonlar yapabileceği ve ilerleyen zamanlarda antibiyotiklere direnç geliştirebileceği dikkate alınmalıdır.

Enterokok kaynaklı bakteriyemi ya da endokardit gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde, hücre duvarına etki eden antibiyotikler ve aminoglikozid (çoğunlukla gentamisin)

kombinasyonu öncelikli olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle yüksek düzey aminoglikozid direnci tedavi planlaması açısından büyük öneme sahiptir.

Yüksek düzeyde gentamisin direnci ilk kez 1979'da saptanmış olup özellikle 1980'lerin sonlarından itibaren hastanelerden yüksek düzey aminoglikozid direnç artışları bildirilmiştir.<sup>169</sup> EARSS 2019 verilerine göre Avrupa'da yüksek düzey gentamisin direncinin yüzdesi *E. faecalis*'te %26,6 iken *E. faecium* direncinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ülkemizde 2016 yılı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) raporuna göre yüksek düzey gentamisin direnci *E. faecalis*'te %57,2, *E. faecium*'da %61,7 olarak bildirilmiştir. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) 2018 verilerinde ise yüksek düzey aminoglikozid direnci *E. faecalis*'te %38, *E. faecium*'da ise %52 olarak raporlanmıştır.

Schouten ve ark.<sup>203</sup>'ün hem vankomisin dirençli enterokok (VRE) hem de yüksek düzey aminoglikoza dirençli enterokokların prevalansını saptamak için tüm Avrupa'dan gönderilen hasta örneklerinin değerlendirildiği çalışmalarında, yüksek düzeyde gentamisin dirençli enterokokların en yüksek prevalansı Yunanistan'da (%48,9) saptanmış olup onu Türkiye (%48,1)'nin izlediği görülmüştür. En düşük prevalansın ise Norveç'te bulunduğu ve onu Rusya, Danimarka ve Fransa'nın izlediği saptanmıştır.

YDAD'nin özellikle ülkemizde bu denli yüksek olması dirence sebep olabilecek direnç genlerini araştırmayı gerekli kılmaktadır. Yüksek düzey aminoglikozid direnci çoğunlukla aminoglikozidleri modifiye eden enzimler sonucu meydana gelmekte olup en yaygın aminoglikozidleri modifiye eden enzim, *aac (6')-Ie-aph(2')-Ia* geni tarafından kodlanan, birbirine kaynaşmış iki enzimden oluşan AAC (6')-APH (2') enzimidir. *Aph (2')-Ib*, *aph (2')-Ic* ve *aph (2')-Id* yapılan çalışmalarda çok daha nadir olarak izlenmektedir.

Diab ve ark.<sup>204</sup> 2019 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarında 120 enterokok türünün 39'unda yüksek düzey gentamisin direnci saptamışlardır. Direnç saptanan izolatların 26'sında (%66,7) aminoglikozid modifiye edici gen olarak *aac (6')-Ie-aph (2')-Ia* varlığı izlenirken, yüksek düzey gentamisin direncini kodlayan *aph (2')-Ib*, *aph (2')-Ic* ve *aph (2')-Id* tespit edilmemiştir. Feizabadi ve ark.<sup>205</sup>'ün Tahran'da yaptıkları çalışmalarında 114 enterokok izolatının 59 tanesinde *aac(6')-Ie-aph (2')-Ia* geni, 2 *E. faecium* kökeninde ise *aph (2')-Ic* geni olduğu tespit edilmiştir. *aph(2')-Ib* ve *aph(2')-Id* geni saptanmamıştır. Özarslan ve ark.<sup>206</sup>'nın vankomisin ve YDAD genlerini araştırdığı

çalışmasında yüksek düzey gentamisin direnç oranını %40 olarak saptamışlardır. 58 kökünde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni saptanmış olup hiçbir kökünde *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri izlenmemiştir. Direnç geni saptanmayan izolatlardaki yüksek düzey aminoglikozid direncinin nedeninin ribozomal mutasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür.

Gentamisinin enterokoklarda daha yaygın olarak kullanılmasından dolayı çalışmamızda gentamisin direncinden sorumlu tutulan gen bölgeleri araştırılmıştır. Çalışmamızda fenotipik olarak yüksek düzey aminoglikozid direnci tespit edilen 100 adet enterokok izolatinın tümünde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* direnç geni tespit edilmiş olup diğer çalışmalar ile benzer şekilde en fazla izlenen direnç geni olduğu görülmüştür. Araştırılan *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* direnç genleri izolatlarda saptanmamıştır. İzolatlarımızın hepsinde aynı direnç geni saptanması nedeniyle direnç genleri ile *asa1*, *esp*, *gelE* genleri ve biyofilm ilişkisi belirlenememiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar içerisinde en sık görüleni üriner sistem enfeksiyonları olup bu çalışmada da 100 enterokok türünün 71'i idrar örneklerinden izole edilmiştir.
2. *Enterococcus faecalis* nozokomiyal enfeksiyonlarda en sık saptanan tür olarak gösterilirken son yıllarda *E. faecium* insidansında artış olduğu dikkati çekmektedir. Çalışmamızda da 100 enterokok suşunun 68'i *E. faecium*, 32'si *E. faecalis* olarak saptanmıştır.
3. Fenotipik yöntemlerle test edilen virülans faktörlerinden biyofilm üretimi ile genotipik yöntemler ile araştırılan virülans genlerinden *asaI*, *esp* ve *gelE* varlığı *E. faecalis*'te *E. faecium*'dan daha yüksek oranda tespit edilmiştir.
4. *asaI*, *esp* ve *gelE* virülans gen varlığı izlenen izolatlarda biyofilm üretimi, bu genleri taşımayan izolatlardan daha yüksek izlenmiştir.
5. Çalışmamızda enterokok izolatlarının en dirençli olduğu antibiyotikler siprofloksasin (%87) ve ampisilin (%69) iken linezolid (%94) en duyarlı antibiyotik olarak belirlenmiştir. Tigesiklin direnci %18 oranında izlenmiş olup tigesiklin direncinin diğer çalışmalara göre daha fazla görülmesinin nedeninin uygunsuz ve uzun süreli antibiyotik kullanımı olduğu düşünülmüştür.
6. Uzun süre antibiyotik tedavisi almış kişiler antibiyotik direnci gelişmesi açısından risk altındadır. Çalışmamızda da uzun süreli antibiyotik kullanan hastalarda teikoplanin ve vankomisin direnci, kullanmayanlara göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır.
7. Çalışmamızda çoklu ilaca dirençli enterokokların özellikle de glikopeptid grubu antibiyotikler ve tigesiklin direncinin saptanması endişe verici bir durum olup klinisyene sunulan terapötik seçeneklerin sayısını sınırlamaktadır.
8. *E. faecium* izolatlarının; ampisilin, teikoplanin ve vankomisin direnç oranı, *E. faecalis* izolatlarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır.
9. Ampisilin direnci, biyofilm aktivitesi saptanan izolatlarda istatistiksel açıdan daha düşük tespit edilmiştir. *asaI*, *esp* ve *gelE* geni tespit edilen izolatlarda ampisilin direnç oranı bu gene sahip olmayan izolatlara göre istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır. Ayrıca *esp*

geni tespit edilen izolatlarda siprofloksasin direnç oranı bu genin saptanmadığı izolatlara göre daha düşük izlenmiştir.

10. Yoğun bakım ünitesinden gönderilen örneklerde; antibiyotik direnç oranının daha fazla görüldüğü *E. faecium*, polikliniklerden gönderilen örneklerde ise virülans geni ve biyofilm üretiminin daha fazla görüldüğü *E. faecalis* istatistiksel olarak daha fazla sayıda tanımlanmıştır.

11. Hastanemizde YBÜ ve çeşitli servislerden izole edilen enterokok izolatlarının tümünün *aac(6')-1e-aph (2'')-1a* yüksek düzey aminoglikozid direnç genine sahip olduğu görülmüştür. Tüm izolatlarda aynı direnç geninin görülmesi; kapı kolu, yatak, termometre gibi yüzeyler üzerinde uzun süre canlı kalabilen türler olan enterokokların hastadan hastaya taşınarak yayılmış olabileceğini düşündürmektedir.

12. İzolatlarımızın hepsinde aynı direnç geni saptanması nedeniyle direnç genleri ile *asaI*, *esp*, *gelE* genleri ve biyofilm ilişkisi belirlenememiştir.

13. Çalışmamızda yüksek düzey aminoglikozid direnci gösteren izolatların %69'unda ampisiline de direnç izlenmektedir. Bu sonuç hastanemizde enterokokların neden olduğu ciddi enfeksiyonların ampirik tedavisinde ampisilin ve aminoglikozid kombinasyonunu kullanırken dikkatli olunması gerekliliğini düşündürmüştür.

14. Çalışmamız, hastanemizdeki enterokok izolatlarının antibiyotik direnç profilleri, biyofilm aktiviteleri, jelatinaz aktiviteleri, virülans genleri ve ülkemizde oldukça yüksek izlenen yüksek düzey aminoglikozid direncine neden olan direnç genleri konusunda geniş bir veri sağlamıştır.

15. Antibiyotiklere direnç, virülans önemli özelliklerden birisi olmakla birlikte çalışmamızda antibiyotiklere duyarlı izolatlarda virülans faktörlerinin daha yaygın olduğu görülmüştür. Özellikle *E. faecalis* izolatlarının her ne kadar antibiyotiklere *E. faecium*'dan daha duyarlı olsa da virülans faktörlerini daha yüksek oranda bulundurduğu saptanmıştır. Bu nedenle *E. faecalis*'in de ciddi enfeksiyonlar yapabileceği akılda tutulmalı ve antimikrobiyal direnç izlenirse dahi hastane enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması sırasında göz ardı edilmemelidir.

16. Antimikrobiyal dirençte artışın izlendiği enterokoklarda hastalığın şiddeti ile ilişkili virülans faktörlerinin belirlenmesi, gelecekteki araştırmaların önemli bir konusu olacaktır.

Enterokokal tutunmayı bloke edebilen veya diğer virölans faktörlerinin etkisini engelleyebilen ajanların geliştirilmesi, antimikrobiyal direnç karşısında terapötik alternatifler sağlayabilecektir.



## 7. ÖZET

### **Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokokların Virülans Faktörlerinin Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnciyle İlişkilendirilmesi**

#### **Giriş ve amaç**

Enterokoklar tüm dünyada yaygın görülen nozokomiyal enfeksiyon etkenidir. Enterokoklara bağlı özellikle endokardit gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılan yüksek düzey aminoglikozidlerde artan direnç, başta direnç genleriyle virülans faktörleri olmak üzere enterokokların daha fazla araştırılmasını gerekli kılmıştır. Çalışmamızda hastanemizin mikrobiyoloji laboratuvarında değerlendirilen klinik örneklerden üretilen yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok suşlarındaki; dirençten sorumlu genlerin araştırılması, virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle saptanması ve direnç genleriyle ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır.

#### **Gereç ve yöntem**

Klinik örneklerden izole edilen yüz yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok suşu çalışmaya alınmıştır. İzolatlar MALDI TOF-MS (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak tanımlanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları test edilmiştir. Hemolizin üretimi, jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretimi fenotipik yöntemler ile belirlenmiştir. Virülans genlerinden *asa1*, *esp* ve *gelE* genleri ile yüksek düzey aminoglikozid direnç genlerinden *aac (6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph (2')-Ib*, *aph (2')-Ic*, *aph (2'')-Id* PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

#### **Bulgular**

Enterokok türlerinin %71'i idrar örneklerinden izole edilmiş olup çoğunluğunu *E. faecium* (%68) izolatları oluşturmaktadır. Fenotipik yöntemlerle belirlenen biyofilm üretimi ile PZR yöntemiyle saptanan virülans genlerinin varlığı *E. faecalis*'te *E. faecium*'dan daha yüksek oranda tespit edilmiştir. *E. faecium* izolatlarının; ampisilin, teikoplanin ve vankomisin direnç oranı, *E. faecalis* izolatlarından istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. Enterokok izolatlarının tümünde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* aminoglikozid direnç geni tespit edilmiştir.

#### **Sonuç**

İzolatların antibiyotik direnci ile virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak araştırılması; çoklu ilaca dirençli enterokok enfeksiyonlarının önlenmesi, kontrolü ve tedavisinde yardımcı olacaktır. Çalışmamızda antibiyotiklere duyarlı izolatlarda virülans faktörlerinin daha yaygın olduğu görülmüştür. Antibiyotiklere duyarlı enterokokların da ciddi enfeksiyonlar yapabileceği akılda tutulmalı, hastane enfeksiyonu kontrol önlemlerinin alınması sırasında göz ardı edilmemelidir.

Anahtar Sözcükler: *Enterococcus spp.*, Virülans, Biyofilm, Aminoglikozid



## 8. ABSTRACT

### Association of Virulence Factors with High Level Aminoglycoside Resistance of Enterococci Isolated from Clinical Specimens

#### Introduction and purpose

Enterococci are common nosocomial infections all over the world. Increased resistance to enterococci in high-level aminoglycosides used in the treatment of serious infections such as endocarditis necessitated further investigation of enterococci, particularly resistance genes and virulence factors. In our study, it was aimed to investigate the genes responsible for resistance, to detect virulence factors by phenotypic and genotypic methods and to associate them with resistance genes in high-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from clinical specimens evaluated in the microbiology laboratory of our hospital.

#### Materials and methods

One hundred high-level aminoglycoside resistant enterococci strains isolated from clinical specimens were included in the study. Isolates were identified using the MALDI TOF-MS (BioMérieux, France) automated system. Antimicrobial susceptibility of isolates was tested by broth microdilution method. Hemolysin production, gelatinase activity and biofilm production were determined by phenotypic methods. Virulence genes *asa1*, *esp*, *gelE* genes and high-level aminoglycoside resistance genes *aac (6')-Ie-aph(2')-Ia*, *aph (2')-Ib*, *aph (2')-Ic*, *aph (2'')-Id* were investigated by PCR method.

#### Results

71% of enterococci species were isolated from urine samples, and most of them were *E.faecium* (68%) isolates. Biofilm production determined by phenotypic methods and the presence of virulence genes determined by PCR method were detected at a higher rate in *E.faecalis* than in *E.faecium*. Ampicillin, teicoplanin and vancomycin resistance rates of *E.faecium* isolates were statistically higher than *E. faecalis* isolates. *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* aminoglycoside resistance gene was detected in all enterococci isolates.

## **Conclusion**

Phenotypic and genotypic investigation of antibiotic resistance and virulence factors of isolates will help in the prevention, control and treatment of multidrug-resistant enterococcal infections. In our study, virulence factors were found to be more common in isolates sensitive to antibiotics. It should be kept in mind that enterococci sensitive to antibiotics can also cause serious infections and should not be ignored during hospital infection control measures.

**Key Words:** *Enterococcus spp.*, Virulence, Biofilm, Aminoglycoside



## 9. EKLER

### OLGU RAPOR FORMU

#### Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokokların Virülans Faktörlerinin Yüksek Düzyer Aminoglikozid Direnciyle İlişkilendirilmesi

<b>Hasta Kodu:</b>	<b>Laboratuvar Dosya No:</b>
<b>Yaş:</b>	<b>Cinsiyet</b> <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> E
<b>Örnek İstem Tarihi</b>	<b>Örneğin Geldiği Birim</b>
<b>Örnek Türü:</b>	<b>Eş zamanlı Üreyen Başka Mikroorganizma:</b> <input type="checkbox"/>
<b>Hastanın Tanısı:</b>	<b>Hastanın Geldiği Yer:</b> Hastane <input type="checkbox"/> Ev <input type="checkbox"/>
<b>Hastaneye Yatma:</b> Yatıyor <input type="checkbox"/> Ayaktan <input type="checkbox"/>	<b>Önceki Servis/Sonraki Servis:</b>
<b>Yatış Tarihi:</b>	<b>Yatıyorsa Enfeksiyon Kaçınıcı Günde Gelişti:</b>
<b>Çıkış Tarihi:</b>	<b>Ex ise Üremenin Kaçınıcı Gününde:</b>
<b>Malignite:</b> <input type="checkbox"/> <b>İmmünsüpresyon:</b> <input type="checkbox"/> <b>KBY:</b> <input type="checkbox"/> <b>KVH:</b> <input type="checkbox"/> <b>DM:</b> <input type="checkbox"/> <b>Pulmoner Hastalık:</b> <input type="checkbox"/> <b>HT:</b> <input type="checkbox"/> <b>SSS Hastalığı:</b> <input type="checkbox"/> <b>KC Fonksiyon Bozukluğu:</b> <input type="checkbox"/>	<b>WBC:</b> <b>CRP:</b> <b>Ateş:</b>
<b>Uzun Süreli Antibiyotik Kullanımı:</b> <input type="checkbox"/> <b>Yoğun Bakım Ünitesi'nde Bulunma:</b> <input type="checkbox"/>	<b>İdrar Sondası:</b> <b>Trakeostomi:</b> <b>IV Katater:</b> <b>Ventilasyon Tüpü:</b> <b>Major Cerrahi Operasyon:</b> <b>Enteral Beslenme:</b>
<b>Kültür-Antibiyogram Sonrası Kullanılan Antibiyotik:</b>	<b>Tedavi Süresi:</b>



## 10. KAYNAKLAR

1. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(6):533-540.
2. Moellering RC. *Enterococcus Species, Streptococcus bovis and Leuconostoc Species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed.; 2005:2411-2417.
3. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *The American Journal of Medicine*. 1991;91(3):72S-75S.
4. Nicoletti G, Stefani S. Enterococci: susceptibility patterns and therapeutic options. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14 Suppl 1:S33-S37.
5. Maschieto A, Martinez R, Palazzo ICV, Darini AL. Antimicrobial resistance of *Enterococcus sp.* isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(7):763-767.
6. Teixeira LM, Carvalho MGS, Shewmaker PL, Facklam RR. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. ASM Press; 2011:350-364.
7. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009;155(6):1749-1757.
8. Moellering RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases*. 1992;14(6):1173-1176.
9. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994;7(4):462-478.
10. Say Coskun US. Investigation of the relationship between virulence factors and antibiotic resistance of enterococci isolates. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 2019;65(2):14-17.
11. Waters CM, Dunny GM. Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(19):5659-5667.
12. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, de Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106(1):1-24.

13. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*. 2006;64(4):313-325.
14. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus spp.* clinical isolates. *Virulence*. 2014;5(5):634-637.
15. Billström H, Lund B, Sullivan Å, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;32(5):374-377.
16. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in *enterococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(8):1563-1571.
17. Thiercelin E. Sur un diplocoque saphrophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *C R Soc Biol*. 1899;5:269-271.
18. Andrews F, Horder T. A study of streptococci pathogenic for man. *Lancet*. 1906;2:708-713.
19. Orla-Jensen S. The lactic acid bacteria. *Mem Acad Royal Sci Danemark Sect Sci Ser*. 1919;5:81-197.
20. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984;34(1):31-34.
21. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(5):000414.
22. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1990;3(1):46-65.
23. Tannock GW, Cook G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: *The Enterococci*. ASM Press; 2002.
24. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, ed. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; February 2, 2014.

25. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012;76(4):685-706.
26. Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;88(2-3):123-131.
27. Martinez-Murcia A. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 1991;80(1):69-74.
28. Collins MD, Jones D, Farrow JAE, Kilpper-Balz R, Schleifer KH. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1984;34(2):220-223.
29. Svec P, Devriese LA, Sedláček I, et al. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(4):1567-1574.
30. Gilmore, Michael S., et al., ed. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Vol. 10. Washington, DC: ASM press, 2002.
31. Devriese LA, Pot B, Collins MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993;75(5):399-408.
32. Genus *Enterococcus* [web page on the Internet] Erişim Tarihi (31.03.2021). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>.
33. Facklam R, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995;8(4):479-495.
34. LaClaire LL, Facklam RR. Comparison of three commercial rapid identification systems for the unusual gram-positive cocci *Dolosigranulum pigrum*, *Ignavigranum ruoffiae*, and *Facklamia* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(6):2037-2042.

35. Olano A, Chua J, Schroeder S, Minari A, la Salvia M, Hall G. Weissella confusa (Basonym: *Lactobacillus confusus*) bacteremia: a Case Report. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(4):1604-1607.
36. Ruoff KL. Miscellaneous Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci: Emerging Opportunists. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(4):1129-1133.
37. Lehman D, Mahon C, Suvarna K. *Streptococcus*, *Enterococcus*, and other catalase-negative gram-positive cocci. In: Textbook of Diagnostic Microbiology. Fourth Edition. Missouri: W.B Saunders Co; 2011:330-351.
38. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical Infectious Diseases. 2009;49(4):543-551.
39. Mundt JO. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. Applied microbiology. 1963;11(2):136-140.
40. Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Cital B, Turan D, Öngen B. Et Al. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişki. Mikrobiyol Bul 2011; 45(3): 430-445.
41. Reza Moaddab S, Töreci K. Enterokok suşlarında tür tayini, vankomisin ve diğer bazı antibiyotiklere direnç aranması. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2000;(30):77-84.
42. Ekin İH, Ates S, Tollu G, et al. The presence and prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains in urine and stool samples. Turkish Journal of Veterinary Research. 2018;2(1):14-18.
43. Willke A. Enterokoklar. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Kitabevi, İstanbul, 2008:2057-2064.
44. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.
45. Fernandes SC, Dhanashree B. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus species*. The Indian Journal of Medical Research. 2013;137(5):981-985.
46. Livornese LL. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Annals of Internal Medicine. 1992;117(2):112-116.

47. Zervos MJ. High-level aminoglycoside-resistant enterococci. Colonization of nursing home and acute care hospital patients. *Archives of Internal Medicine*. 1987;147(9):1591-1594.
48. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2012;10(4):266-278.
49. Harbarth S, Uckay I. Are there patients with peritonitis who require empiric therapy for *Enterococcus*? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2004;23(2):73-77.
50. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *The Indian Journal of Medical Research*. 2008;128(2):111.
51. Çavuşlu Ş. Enterokok infeksiyonları. In: Pekcan M, Pahsa A, Görenek L, Beşirbellioğlu B.A, ed. Hastane Enfeksiyonları. Gata yayımları; 2005:353-373.
52. Esen Ş. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar ve tedavi seçenekleri. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, ed. Önemli ve sorunlu Gram-pozitif bakteri enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Kitabevi; 2012:245-261.
53. Hill EE, Herijgers P, Claus P, Vanderschueren S, Herregods M-C, Peetermans WE. Infective endocarditis: changing epidemiology and predictors of 6-month mortality: a prospective cohort study. *European Heart Journal*. 2006;28(2):196-203.
54. Fernández Guerrero ML, Goyenechea A, Verdejo C, Roblas RF, de Górgolas M. Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves. *Medicine*. 2007;86(6):363-377.
55. Coudron PE, Mayhall CG, Facklam RR, et al. *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984;20(6):1044-1048.
56. Crank C, O'Driscoll T. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*. 2015;8:217.
57. Yıldırım M. Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen enfeksiyonlar. *Duzce Medical Journal*. 2007;9(2):46-52.
58. DiazGranados CA, Zimmer SM, Klein M, Jernigan JA. Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal

- bloodstream infections: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(3):327-333.
59. Garrison RN, Fry DE, Berberich S, Polk HC. Enterococcal bacteremia clinical implications and determinants of death. *Annals of Surgery*. 1982;196(1):43.
60. Karagöz G. Yoğun bakım ünitesinde vankomisin dirençli enterokok taşıyıcılığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 2005.
61. Kaye D. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Archives of Internal Medicine*. 1982;142(11):2006-2009.
62. Yamazhan T, Ulusoy S. Vankomisin dirençli enterokoklar. In: Doanay M., Ünal S., Ardan Y.Ç., ed. *Hastane Enfeksiyonları*. Bilimsel Tıp Kitapevi; 2013:343-361.
63. Pintado V, Cabellos C, Moreno S, Meseguer MA, Ayats J, Viladrich PF. Enterococcal meningitis. *Medicine*. 2003;82(5):346-364.
64. Guzmàn CA, Pruzzo C, LiPira G, Calegari L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infection and Immunity*. 1989;57(6):1834-1838.
65. Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2016;20(2):491-498.
66. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 2002;417(6890):746-748.
67. Upadhyaya PG, Ravikumar K, Umopathy B. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009;27(4):301-305.
68. Baysal,Ş. “Enterokokların virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması ve antibiyotik direnci ile ilişkisinin değerlendirilmesi”. Tıpta Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, 2019.
69. Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunny GM, Rakita RM. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent

- binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1999;26(1):49-60.
70. Baghdayan AS, Shankar N, Tendolkar PM. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2003;60(12):2622-2636.
  71. 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. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;171(5):1223-1229.
  72. 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. *Infection and Immunity*. 1999;67(1):193-200.
  73. Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. Biofilm-associated proteins. *Comptes Rendus Biologies*. 2006;329(11):849-857.
  74. 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. *Journal of Bacteriology*. 2004;186(3):672-682.
  75. Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infection and Immunity*. 1995;63(2):703-706.
  76. Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, et al. Pathogenesis and models of enterococcal infection. *Enterococci: From Commensals To Leading Causes Of Drug Resistant Infection*; 2014.
  77. Low YL, Jakubovics NS, Flatman JC, Jenkinson HF, Smith AW. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2003;52(2):113-119.
  78. Haas W, Shepard BD, Gilmore MS. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature*. 2002;415(6867):84-87.
  79. Coburn PS. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science*. 2004;306(5705):2270-2272.

80. Van Tyne D, Martin M, Gilmore M. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*. 2013;5(5):895-911.
81. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. *Infection and Immunity*. 1984;45(2):528-530.
82. Chow JW, Thal LA, Perri MB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37(11):2474-2477.
83. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid*. 1995;34(2):152-156.
84. Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1987;25(8):1524-1528.
85. Bleiweis AS, Zimmerman LN. Properties of proteinase From *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens. *Journal of Bacteriology*. 1964;88(3):653-659.
86. Qin X, Singh K v., Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infection and Immunity*. 2000;68(5):2579-2586.
87. Novick RP, Geisinger E. Quorum Sensing in Staphylococci. *Annual Review of Genetics*. 2008;42(1):1429-1449.
88. Dupont H, Montravers P, Mohler J, Carbon C. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infection and Immunity*. 1998;66(6):2570-2575.
89. Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998;178(5):1416-1420.
90. Kayaoglu, G., & Ørstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(5), 308-320.
91. Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(38):26939-26945.



92. Singh K v., Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. PLoS Pathogens. 2010;6(1):1000716.
93. 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. Molecular Microbiology. 2003;47(6):1733-1747.
94. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, et al. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. Microbiology. 2008;154(10):3199.
95. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2010;74(3):413-433.
96. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases. 2002;8(9): S47-S52.
97. Bothwell M. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. Otolaryngology - Head and Neck Surgery. 2003;129(5):599-601.
98. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 2002;15(2):167-193.
99. 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. Infection and Immunity. 1981;33(1):29-33.
100. Palmer RJ, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. Trends in Microbiology. 1997;5(11):435-440.
101. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000;64(4):847-867.
102. Paganelli FL, Willems RJ, Leavis HL. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? Trends in Microbiology. 2012;20(1):40-49.
103. Bourgoigne A, Hilsenbeck SG, Dunny GM, Murray BE. Comparison of *OGIRF* and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the *fsr* system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. Journal of Bacteriology. 2006;188(8):2875-2884.

104. Nallapareddy SR, Singh K v., Sillanpaa J, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. Journal of Clinical Investigation. 2006;116(10):2799-2807.
105. Ciftci A, Aksoy A. Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics. 2015;1:1-10.
106. Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg H-D, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001;45(7):2054-2059.
107. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium* : from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2008;52(3):297-308.
108. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Review Of Anti-Infective Therapy. 2014;12(10):1221-1236.
109. Williamson R, le Bouguenec C, Gutmann L, Horaud T. One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. Microbiology. 1985;131(8):1933-1940.
110. Murray BE, Church DA, Wanger A, et al. Comparison of two beta-lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1986;30(6):861-864.
111. Mainardi J-L, Morel V, Fourgeaud M, et al. Balance between two transpeptidation mechanisms determines the expression of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(39):35801-35807.
112. Lefort A, Mainardi J-L, Tod M, Lortholary O. Antienterococcal antibiotics. Medical Clinics of North America. 2000;84(6):1471-1495
113. Shete V, Grover N, Kumar M. Analysis of aminoglycoside modifying enzyme genes responsible for high-level aminoglycoside resistance among enterococcal isolates. Journal of Pathogens. 2017; 2017:3256952.
114. Ziglam HM, Finch RG. Limitations of presently available glycopeptides in the treatment of Gram-positive infection. Clinical Microbiology and Infection. 2001; 7:53-65.

115. Freitas AR, Tedim AP, Francia M v., et al. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(12):3351-3366.
116. Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*. 1993;175(1):117-127.
117. Quintiliani R, Evers S, Courvalin P. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;167(5):1220-1223.
118. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a d-alanine:d-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene*. 1992;112(1):53-58.
119. Perichon B, Casadewall B, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a VanD-type strain with an impaired d-alanine:d-alanine ligase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(5):1346-1348.
120. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a New type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(9):2161-2164.
121. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic Characterization of *vanG*, a Novel Vancomycin Resistance Locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(11):3224-3228.
122. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(7):2667-2672.
123. Xu X, Lin D, Yan G, et al. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(11):4643-4647.
124. Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium*

- resistance to therapeutic antimicrobial drugs in europe. *Emerging Infectious Diseases*. 1999;5(3):329-335.
125. Zalipour M, Esfahani BN, Havaei SA. Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*: a multicenter based study. *BMC Research Notes*. 2019;12(1):292.
  126. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(4):967-971.
  127. Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde-Gomez JA, Klare I, Witte W. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;35(2):119-125.
  128. El Khoury J, Fishman JA. Linezolid in the treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in solid organ transplant recipients: report of a multicenter compassionate-use trial. *Transplant Infectious Disease*. 2003;5(3):121-125.
  129. Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(10):3334-3336.
  130. Shinabarger DL, Marotti KR, Murray RW, et al. Mechanism of action of oxazolidinones: effects of linezolid and eperezolid on translation reactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(10):2132-2136.
  131. Niebel M, Perera MTPR, Shah T, et al. Emergence of linezolid resistance in hepatobiliary infections caused by *Enterococcus faecium*. *Liver Transplantation*. 2016;22(2):201-208.
  132. Roberts MC, Schwarz S. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. Humana Press; 2009:231-243.
  133. Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*. 1996;165(6):359-369.
  134. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2000;37(2):127-137.

135. Bradford PA. Tigecycline: a first in class glycylycylcline. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2004;26(21):163-168.
136. Cattoir V, Isnard C, Cosquer T, et al. Genomic analysis of reduced susceptibility to tigecycline in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(1):239-244.
137. Fiedler S, Bender JK, Klare I, et al. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants *tet (L)* and *tet (M)*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(4):871-881.
138. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
139. Mete E, Kaleli İ, Cevahir N, Demir M, Akkaya Y, Kiriş Satılmış Ö. Enterokok türlerinin virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2017;51(2):101-114.
140. <https://microbeonline.com/gelatin-hydrolysis-test-principle-procedure-expected-results/>.
141. Kafil HS, Mobarez AM. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. *Journal of King Saud University-Science*. 2015;27(4):312-317.
142. Gültaş N, Bayrakal V, Bahar İH. Evaluation of the relationship between microenvironment and biofilm and coagulase responses of *Staphylococcus aureus* strains under the effect of gentamicin. *Mikrobiyoloji Bulteni*. Published online January 24, 2013:19-26.
143. Gür D, Çöplü N, Gülay D, Hasdemir U, Karahan Zc, Karatuna O. Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: Uygulama, yorum ve uzman kurallar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2016;46:2-25.
144. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2021;Version 11.
145. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid*. 1995;34(2):152-156.
146. Mannu L, Paba A, Daga E, et al. 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*. 2003;88(2-3):291-304.
147. Qu T-T, Chen Y-G, Yu Y-S, Wei Z-Q, Zhou Z-H, Li L-J. Genotypic diversity and epidemiology of high-level gentamicin resistant *Enterococcus* in a Chinese hospital. *Journal of Infection*. 2006;52(2):124-130.
148. Hoge CW, Adams J, Buchanan B, Sears SD. Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal. *Clinical Infectious Diseases*. 1991;13(4):600-605.
149. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993;6(4):428-442.
150. Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The Clinical significance of positive blood cultures: A Comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Clinical Infectious Diseases*. 1983;5(1):54-70.
151. Shahi F, Hamidi H, Khoshnood S, Mehdipour G, Dezfouli A, Sheikh A. Virulence determinants and biofilm formation in clinical isolates of *Enterococcus*: A cross-sectional study. *Journal of Acute Disease*. 2020;9(1):27.
152. Cömert F, Külah C, Eroğlu Ö, Aktaş E. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen enterokok izolatlarının üç yıllık değerlendirmesi. *Flora Derg* . 2007;12:98-102.
153. 16. Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer Eİ. Kan kültürlerinden izole edilen enterokoklarda antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* . 2011;4:103-106.
154. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1989;33(1):10-15.
155. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1991;35(8):1626-1634.
156. Kashef M, Alvandi A, Hasanvand B, Azizi M, Abiri R. Virulence factor and biofilm formation in clinical enterococcal isolates of the West of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2017;10(7):14379.

157. Comerlato CB, Resende MCC de, Caierão J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):590-595.
158. Komiyama EY, Lepesqueur LSS, Yassuda CG, et al. *Enterococcus* species in the oral cavity: Prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *Plos one*. 2016;11(9):0163001.
159. Golob M, Pate M, Kušar D, et al. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *BioMed Research International*. 2019;2019:2815279.
160. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The Enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(10):4538-4545.
161. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*. 2003;52(6):491-498.
162. Almohamad S, Somarajan SR, Singh K v., Nallapareddy SR, Murray BE. Influence of isolate origin and presence of various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*. 2014;353(2):151-156.
163. Rosa R, Creti R, Venditti M, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters*. 2006;256(1):145-150.
164. Dale JL, Cagnazzo J, Phan CQ, Barnes AMT, Dunny GM. Multiple roles for *Enterococcus faecalis* glycosyltransferases in biofilm-associated antibiotic resistance, cell envelope integrity, and conjugative transfer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(7):4094-4105.
165. Esen Ş, Sünbül M, Şener B, Eroğlu C, Saniç A, Leblebicioğlu H. Glikopeptid, beta-laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklerin enterokoklara in-vitro etkinliği. *Ankem Derg*. 2001;15(1):59-63.

166. Meriç M, Rüzgar M, Gündeş S, Willke A. Hastanede yatan hastalardan izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere direnç durumu. *Ankem Derg.* 2004;18(3):141-144.
167. Kaçmaz B, Akca G, Sultan N. Enterokokların antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *İnfeksiyon Derg.* 2004;18(3):287-292.
168. Dinç M, Arca A, Yağcı S, Karabiber N. In-vitro antibiotic susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from various clinical samples. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2009;66(3):117-121.
169. Huycke M. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases.* 1998;4(2):239-249.
170. Özseven AG, Çetin E, Arıdoğan B, Çiftçi E, Özseven L. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg.* 2011;25(4):256-262.
171. İraz M, Ceylan A, Akkoyunlu Y. Antibiotic susceptibility of *Enterococcus* strains isolated from various clinical samples. *Ankem Derg.* 2012;26(4):176-180.
172. Rathe M, Kristensen L, Ellermann-Eriksen S, Thomsen MK, Schumacher H. Vancomycin-resistant *Enterococcus spp.*: validation of susceptibility testing and in vitro activity of vancomycin, linezolid, tigecycline and daptomycin. *APMIS.* 2010;118(1):66-73.
173. Manoharan A, Chatterjee S, Madhan S, Mathai D. Evaluation of tigecycline activity in clinical isolates among Indian medical centers. *Indian Journal of Pathology and Microbiology.* 2010;53(4):734-737.
174. Dadashi M, Sharifian P, Bostanshirin N, et al. The Global prevalence of daptomycin, tigecycline, and linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains from human clinical samples: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine.* 2021;8:720647.
175. Kessel J, Bender J, Werner G, et al. Risk factors and outcomes associated with the carriage of tigecycline- and vancomycin-resistant. *Journal of Infection.* 2021;82(2):227-234.
176. Uttley Anne HC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet.* 1988;331:8575-8576.



177. Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *Ankem Derg.* 1999;13(1):1-4.
178. d'Azevedo PA, Furtado GH, Medeiros EA, Santiago KA, Silbert S, Pignatari AC. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococci* strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 2008;50(4):195-198.
179. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Evaluation of the antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species isolated from urine cultures. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2014;44:107-113.
180. Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *Infeks Derg.* 2009;23:201-209.
181. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nosocomial enterococci resistant to vancomycin--United States, 1989-1993. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 1993;42(30):597-599.
182. Wang J-L, Hsueh P-R. Therapeutic options for infections due to vancomycin-resistant enterococci. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2009;10(5):785-796.
183. Sadowy E. Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid.* 2018;99:89-98.
184. Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid resistance in staphylococci. *Pharmaceuticals.* 2010;3(7):1988-2006.
185. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein H-J, Hanberger H, Nilsson LE. 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.* 2009;299(5):323-332.
186. Arshadi M, Douraghi M, Shokoohizadeh L, Moosavian SM, Pourmand MR. High prevalence of diverse vancomycin resistance *Enterococcus faecium* isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran. *Microbial Pathogenesis.* 2017;111:212-217.
187. Chow JW, Thal LA, Perri MB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1993;37(11):2474-2477.

188. Jovanović M, Tošić T, Jovanović S, et al. Presence of the *esp* gene in *Enterococcus faecium* derived from oropharyngeal microbiota of haematology patients. Archives of Oral Biology. 2018;88:54-59.
189. Vergis EN, Shankar N, Chow JW, et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clinical Infectious Diseases. 2002;35(5):570-575.
190. Hasani A, Sharifi Y, Ghotaslou R, et al. Molecular screening of virulence genes in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens in Northwest Iran. Indian Journal of Medical Microbiology. 2012;30(2):175-181.
191. Sujatha S, Chandra P, Ira P. Virulence factors in clinical and commensal isolates of *Enterococcus* species. Indian Journal of Pathology and Microbiology. 2013;56(1):24-30.
192. Woodford N, Soltani M, Hardy KJ. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. The Lancet. 2001;358(9281):584.
193. López-Salas P, Llaca-Díaz J, Morfin-Otero R, et al. Virulence and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* clinical isolates recovered from three states of Mexico. Detection of Linezolid Resistance. Archives of Medical Research. 2013;44(6):422-428.
194. Çopur Ş, Şahin F, Göçmen JS. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and -resistant enterococci isolated from clinical samples. Turkish Journal of Medical Sciences. 2016;46:877-891.
195. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2013;3(1):197-201.
196. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, et al. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from clinical specimens of hospitalized patients of North west of Iran. The Open Microbiology Journal. 2012;6:34-39.

197. Udo EE, Al-Sweih N. Frequency of virulence-associated genes in; *Enterococcus faecalis*; isolated in Kuwait Hospitals. Medical Principles and Practice. 2011;20(3):259-264.
198. Creti R, Imperi M, Bertuccini L, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. Journal of Medical Microbiology. 2004;53(1):13-20.
199. Zou L-K, Wang H-N, Zeng B, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. The New Microbiologica. 2011;34(1):73-80.
200. Al-Talib H, Zuraina N, Kamarudin B, Yean C. Genotypic variations of virulent genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from three hospitals in Malaysia. Advances in Clinical and Experimental Medicine. 2015;24(1):121-127.
201. Lindenstrauß AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Systematic and Applied Microbiology. 2011;34(8):553-560.
202. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clinical Microbiology Reviews. 2013;26(2):185-230.
203. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Meis JFG, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2000;19(11):816-822.
204. Diab M, Salem D, El-Shenawy A, et al. Detection of high level aminoglycoside resistance genes among clinical isolates of *Enterococcus* species. Egyptian Journal of Medical Human Genetics. 2019;20(1):1-6.
205. Feizabadi MM, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. Microbial Drug Resistance. 2006;12(4):265-268.

206. Ozarslan Kurtgoz S, Ozer B, Inci M, Duran N, Yula E. Vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* species. *Microbiology Research*. 2016;7(1):23-28.

