

# ENTEROKOK TÜRLERİNDE GLİKOPEPTİD GRUBU ANTİBİYOTİKLERE DİRENCİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARI VE GEN AKTARIM YOLLARI

## Molecular Mechanisms of Resistance to Glycopeptide Antibiotics in *Enterococcus* Species and Modes of Gene Transfer

Arzu ÇÖLERİ, Cumhur ÇÖKMÜŞ

Ankara Üniversitesi,  
Fen Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü,  
ANKARA

İletişim:  
Arzu ÇÖLERİ  
Ankara Üniversitesi,  
Fen Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü, 06100  
Tandoğan / ANKARA  
Tel: +90 312 2126720/1095  
Faks: +90 312 2232395  
E-posta: arzucoieri@gmail.com

### ÖZET

Enterokoklar özellikle 1980'lerden sonra en önemli nosokomiyal enfeksiyon etkenlerinden biri haline gelmiş ve antibiyotiğe dirençli fırsatçı patojenler olarak dikkatleri üzerine çekmişlerdir. Son yıllarda çoklu antibiyotik direnci gösteren enterokok suşlarının ortaya çıkması ile enfeksiyonlarda kullanılan mevcut tedavi yöntemlerinin uygulanabilirliği kısıtlanmış ve glikopeptid, penisilin ve aminoglikozit grubu antibiyotiklere direnç geni taşıyan enterokok enfeksiyonları halk sağlığını tehdit eder olmuştur. Özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid grubu antibiyotiklere kazanılmış ve indüklenebilir yüksek seviyede direnç içeren Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) suşlarının sayısı giderek artmıştır. Şu ana kadar enterokoklarda *van A*'dan *van G*'ye kadar vankomisin direncinden sorumlu olduğu bilinen yedi farklı gen kümesinin dizilemesi yapılmış ve varlığı gösterilmiştir. Bu gen kümelerinden en iyi tanımlanan *van A* ve *van B* kümeleri olup klinik enterokoklarda en çok karşılaşılan direnç tiplerini oluştururlar. *Van A* tipi direnç gösteren VRE suşlarında görülen direncin nedeni, hücre duvarındaki peptidoglikan öncüsü D-ala-D-ala dipeptidinin, D-ala-D-lak depsi-peptidi ile yer değiştirilmesi sonucu glikopeptidin 1000 kat daha az ilgiyle substratına bağlanabildiği bir modifikasyon ile vankomisinin hücre duvarı sentezini inhibe etmesinin engellenmesidir. *Van C*, *Van E* ve *Van G* tipi dirençlerde ise D-ala-D-serin şeklinde değişim söz konusudur. Bu direnç genlerinin enterokoklar arasında ve özellikle diğer Gram pozitif bakterilere plazmid ve transpozonlar aracılığıyla aktarımı, direncin hızla yayılmasına neden olarak tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Bu derlemede tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de geliştirdiği direnç mekanizmaları ile antibiyotik direncinin yayılımına yol açan enterokoklarda direnç kaynaklarının moleküler mekanizmaları irdelenmiş ve bu direnç kaynaklarının bilinmesinin, direncin önlenmesi ve yeni antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmesi açısından önemi vurgulanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Enterokoklar, glikopeptid direnci, direnç genleri, direncin yayılımı

### ABSTRACT

Enterococci have emerged as major antibiotic-resistant opportunistic pathogens causing nosocomial infections, especially after 1980's. In the last decade, currently available alternatives for therapy of enterococcal infections became limited due to multiple antibiotic resistant strains and these enterococcal infections caused by these strains carrying glycopeptide, penicilin and aminoglycoside resistance genes, began to treat public health. Particularly the number of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) have increased, carrying acquired and inducible high-level resistance genes to glycopeptide antibiotics in the course of time. Till now, seven different gene clusters responsible for glycopeptide resistance were sequenced and demonstrated from *van A* to *van G*. Of these clusters *van A* and *van B* gene clusters codes for the best described and the most encountered resistance phenotypes among

clinical enterococci. The reason of Van A type glycopeptide resistance in enterococci is to prevent vancomycin to inhibit cell wall synthesis by modification of cell wall precursor D-Ala-D-Ala dipeptide to D-Ala-D-Lac depsipeptide which leads binding of vancomycin to its substrate with 1000-times lower affinity. In Van C, Van E and Van G type resistance, the modification is on D-Ala-D-ser dipeptide. Plasmid and transposon-mediated transfer of these resistance genes between enterococci and specially to other Gram positive bacteria caused spread of resistance which reached to dangerous dimensions. In this review, it is emphasized the importance of knowing the source of genetic fundamentals in terms of controlling antibiotic resistance, and implementing new antibiotic policies for the control of enterococci which gave rise to the spread of resistance by developing antibiotic resistance mechanisms not only worldwide but also in Turkey.

**Key Words:** Enterococci, glycopeptide resistance, resistance genes, spread of resistance



## GİRİŞ

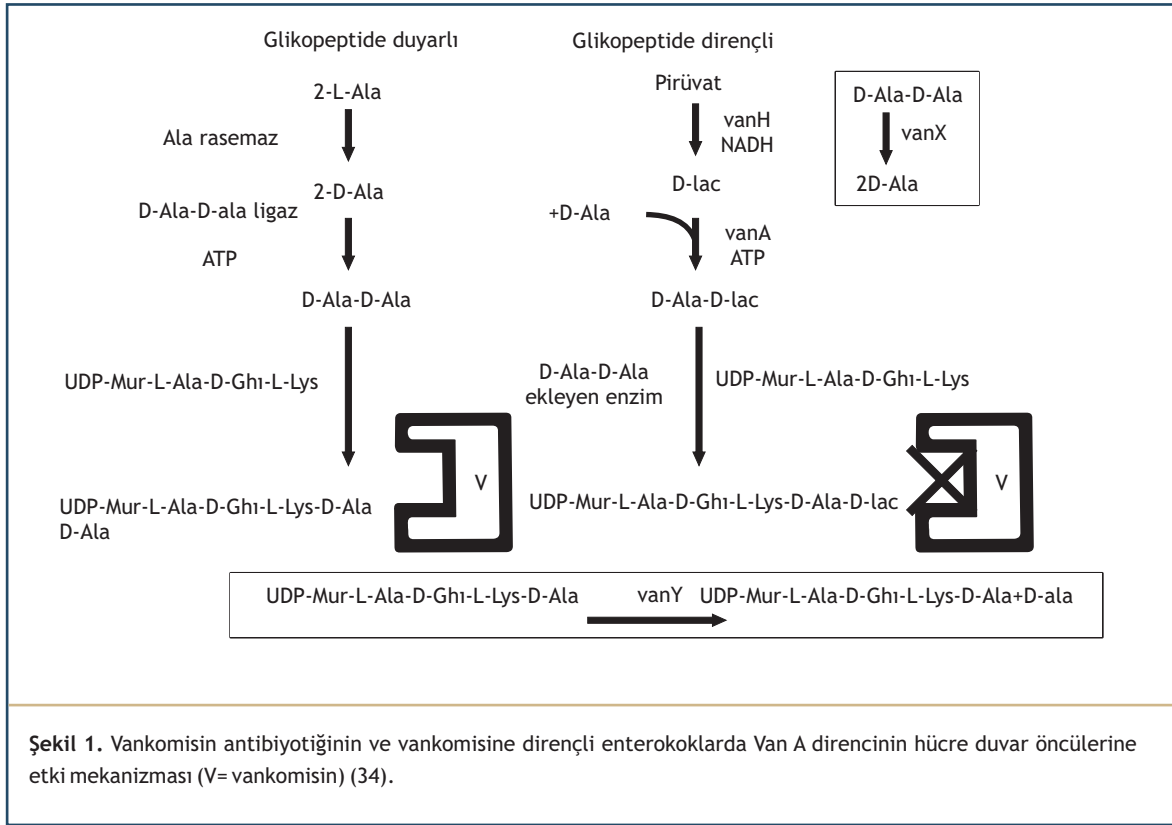
Son yıllarda özellikle antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri çoklu antibiyotik direnci sebebiyle enterokokların neden olduğu idrar yolu enfeksiyonları, safra kesesi enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonların sayısında dünya çapında büyük bir artış görülmüştür. Bu artışın bir diğer sebebi de uygun virulans özelliklerini taşıyan ve hastane çevresine adapte bazı klonların ortaya çıkmasıdır. Enterokoklarda glikopeptid grubu antibiyotiklere direnç ilk olarak 1988'de bildirilmiş, daha sonra vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli suşlar tüm dünyada yayılmıştır (1). Yapılan çalışmalarda glikopeptid dirençli enterokokların oldukça geniş coğrafik yayılım gösterdikleri ve hem fenotipik hem de genotipik olarak heterojen oldukları belirlenmiştir (2). Direnç genlerinin enterokoklar arasında ve özellikle diğer gram pozitif bakterilere plazmid ve transpozonlar aracılığıyla aktarımı, direncin hızla yayılmasına neden olarak Amerika ve Avrupa'da tehlikeli boyutlara ulaşmıştır (3-11). Türkiye'de ise Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) izolasyonunun ilk olarak 2001 yılı sonrasında yapıldığı rapor edilmiş ve bu tarihten sonra ülkemizdeki VRE olgularında artış görülmüştür (12-15).

Klasik olarak üriner sistem dışındaki endokardit ve bakteriyemi gibi ciddi enterokok enfeksiyonlarının tedavisi için,  $\beta$ -laktam veya glikopeptid grubu antibiyotiklerin aminoglikozit ile kombine tedavisi ge-

rekmetedir. 2007 Avrupa Antibiyotik Direnci Sürveyans Sistemi (EARSS) verilerine göre, özellikle hücre duvar inhibitörlerinden glikopeptidlere karşı direnç oranları ülkemizde çok yüksek olmayıp; *Enterococcus faecium* izolatlarında %9.8; *E. faecalis*'de ise %1'in altındadır. Buna karşın sinerjik etkileşimi ortadan kaldıran yüksek düzey aminoglikozid direnci: *E. faecalis* için %30; *E. faecium* için %69 civarında olup bu oran, yüksek seviye kabul edilir (www.earss.rivm.nl). Enterokoklarda görülen direnç, bu tür kombinasyonların kullanımında ciddi sağaltım sorunlarına yol açmaktadır (16, 17). Bu nedenlerle tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de geliştirdiği direnç mekanizmaları ile antibiyotik direncinin yaygınlaştığı enterokoklarda doğru tür teşhisi, antibiyotik duyarlılık testlerinin optimize edilmesi ve direnç kaynaklarının genetik temelini araştırılması; direncin önlenmesi ve yeni antibiyotik kullanım politikaları geliştirilmesi açısından önemlidir (18).

## Enterokoklarda Glikopeptidlere Karşı Geliştirilmiş Direnç Mekanizmaları

Enterokoklarda glikopeptid direnci, Van A'dan Van G'ye kadar çeşitlilik gösterebilen farklı direnç fenotipleri ile eksprese olur. Ancak direnç mekanizması tüm fenotiplerde benzerlik gösterip, vankomisinin hedefine daha düşük bir ilgi ile bağlanması ile sonuçlanır. Şekil 1'de de gösterildiği üzere ortamda vankomisin gibi bir indükleyici bulunduğu, sensör kinaz enziminin bir regülatör yanıt proteini ile



ilişkiye girmesi sonucu, vankomisin direncinden sorumlu genlerin transkripsiyonu uyarılır. Transkripsiyona uğrayan genler transle olarak vankomisin çok düşük bir ilgi ile bağlanabildiği ve D-ala-D-lak veya D-ala-D-ser ile sonlanan hücre duvarı öncülerinin oluşumunu sağlayan ligaz enzimlerine dönüşürler. Diğer gen ürünleri ise Dala-Dala dipeptidlerini keserek hücre duvarının esas yapısında bulunan glikopeptidlere duyarlı hedefleri ortadan kaldırırlar. VRE'lerde peptidoglikan öncülüğündeki bu değişiklikler, glikopeptid ajanların hedefine 1000 kat daha düşük bir ilgi ile bağlanmasına neden olur ve hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, bu temel mekanizma ile engellenir (19, 20).

#### Enterokoklarda Antibiyotik Direncinin Genetik Organizasyonu

Son zamanlarda VRE olgularındaki artış, araştırmacıları direnç genlerince kodlanan proteinlerin ya-

pılarını ve işlevlerini daha kapsamlı şekilde çalışmaya itmiş ve yüksek düzey glikopeptid direncine sahip enterokok suşlarının fenotipik özelliklerini kodlayan genetik bilgilere ulaşmayı kolaylaştırmıştır. Bu bilgiler ışığı altında vankomisine dirençli enterokoklar, bakterinin sadece vankomisin ya da hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli olması, direncin indüklenebilir veya yapısal olması ve diğer bakterilere aktarılabilir olup olmamasına göre yapılan sınıflandırmada Van A'dan Van G'ye kadar isimlendirilen yedi farklı grup altında incelenirler (Tablo 1). Bu glikopeptid direnç tipleri içerisinde en iyi tanımlanmış olanları Van A, Van B, Van C ve Van D dirençleridir (2, 11).

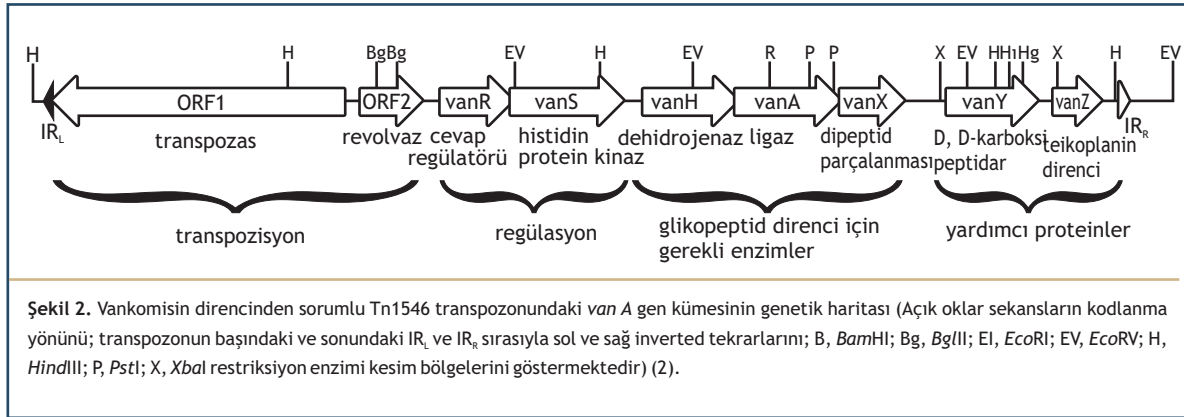
**Van A tipi direnç:** Van A tipi direnç enterokoklarda en iyi tanımlanmış direnç mekanizmasıdır. Vankomisine ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençten, 39-40 kDa ağırlığında, Van A sitoplazmik proteinleri sorumludur. Dirence neden olan proteinler

Tablo 1. Enterokoklarda glikopeptid direnç tipleri (19, 20)

Özellik	Van A	Van B	Van C	Van D	Van E
<b>MİK(µg/ml)</b>					
Vankomisin	64 ila >1000	4 ila >1000	2 ila 32	16 ila 64	16
Teikoplanin	16 ila > 512	0.5 ila > 32	0.5 ila 1	2 ila 4	0.5
<b>Transfer edilebilme</b>	+	+	-	-	?
<b>Direnç genlerinin lokasyonu</b>	Plazmidler	Kromozom (plazmidler)	Kromozom	Kromozom	Kromozom
<b>İndüklenme ile ekspresyon</b>					
Vankomisin	+	+	-	+	+
Teikoplanin	+	-	-	-	-
<b>Hareketli element</b>	Tn 1546	Tn 1547	-	?	?
<b>Ligaz geni</b>	<i>van A</i>	<i>van B</i>	<i>van C-1</i> ve <i>van C-2/van C-3</i>	<i>van D</i>	<i>van E</i>
<b>Direnç tipi</b>	Kazanılmış Direnç	Kazanılmış direnç	İntirinsik Direnç	Kazanılmış direnç	Kazanılmış direnç
<b>Direnç proteinin M.A'lığı(kDa)</b>	39-40	39.5	38	?	?
<b>Modifiye edilmiş hedef</b>	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser
<b>Türler</b>	<i>E. faecalis</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. faecium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. durans</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>

ancak vankomisin varlığında sentezlenebilen ve hücre duvar sentezi için mutlaka gerekli olan bir ligaz (*van A* genince kodlanır), bir D-D-dipeptidaz (*van X* genince kodlanır) ile bir D,D-karboksipeptidaz'dır (*van Y* geni tarafından kodlanan bu enzim *van X* genince kodlanan protein ile benzer aktivitededir ancak direnç için mutlaka gerekli değildir). Van A fenotipi vankomisine (MİK: >64-1000 µg/ml) ve te-

ikoplanine (MİK: >16-512 µg/ml) yüksek düzeyde indüklenebilir dirence yol açar veya yol açması ile tanımlanır. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-lac'dır. Bu tip direnç gelişimi özellikle *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* ve nadiren *Enterococcus avium*'da görülmektedir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi yedi genden oluşan *vanA* kümesi (*van R*, *van S*, *van H*, *van A*, *van X*, *van Y* ve *van Z*) plazmid DNA'ya entegre



olmuş bir transpozon üzerinde yerleşmiştir. Tn1546 olarak adlandırılan 10.5 kb'lık bu transpozon, dört fonksiyonel grubun toplam dokuz polipeptidi kodladığı genetik bir elemandır (2, 22). Tn1546, Tn3 transpozon ailesine benzerlik gösterip baş ve son kısmında 36 ile 38 bp'lik "inverted" diziler içerir. Bu "inverted" diziler sayesinde direnç genleri, üzerinde bulunduğu plazmiden çıkıp tekrar başka bir plazmide rahatlıkla entegre olabilir. Bu transpozonu oluşturan fonksiyonel gruplardan ilki transpozisyonunda görev alan ve ters yönde transkripsiyona uğrayan açık okuma bölgeleri olup, bunlardan ORF1 yapısal bir transpozazı ve ORF2 ise bir rezolvazı kodlar. İkinci bölgede vankomisin direnç genlerinin regülasyonundan sorumlu *van R* ve *van S* genleri mevcuttur. Bu iki gen, glikopeptidlere cevap olarak, iki bileşenli bir sinyal regülasyon sistemi ile *van H*, *van A* ve *van X* genlerinin transkripsiyonlarını aktive ederek depsipeptid oluşumunu kontrol ederler. Üçüncü fonksiyonel grup, depsipeptidlerin oluşumundan ve glikopeptid direncinden sorumlu genleri (*van H*, *van A* ve *van X*) içerir. Üçüncü bölgedeki *vanA* geni geniş substrat özgüllüğüne sahip bir ligazı, *van H* geni ise peptidoglikan sentezinde D-Ala-D-Ala'nın D-Ala-D-Lac ile yer değiştirildiği yeni depsipeptidin sentezinde gerekli bir dehidrojenazı kodlar. *van X* geninin görevi, direnç ekspresyonu için mutlaka gerekli olan ve dipeptid parçalanmasından sorumlu bir D-D-dipeptidazın kodlanmasıdır. Son fonksiyonel gruptaki *van Y* geni ise *van X* ile benzer işlev gösterir; ancak

glikopeptid direnci için tam olarak esansiyel olmayan bir D, D-karboksipeptidazı kodlar. Entero-koklarda Van A fenotipi içeren elemanlar birbirlerine benzerlik gösterir ve Tn1546 ile taşınır; ancak bazı VRE suşlarının intergenik bölgelerine bazı hareketli insersiyon dizilerinin entegre olmasından dolayı direnç düzeylerinde varyasyonlar görülebilmektedir. Kazanılmış (acquired) direnç genleri çoğunlukla geniş konakçı profili gösteren plazmidler ve konjugatif transpozonlar aracılığı ile diğer türlere kolaylıkla aktarılabilir. Bunlar arasında en dikkat çekici olanı, *van A* genini içeren vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) izolatlarının olmasıdır (4, 9, 16, 17, 23-25, 33).

**Van B tipi direnç:** Van B tipi direnç; Tn1547 transpozonunu üzerinde kodlu olan *vanB* geninin sentezlediği 39.5 kDa moleküler ağırlıklı Van B membran proteini ile oluşturulur. Vankomisin direnci orta düzeyde olup, dirençli bakteriler vankomisine dirençli (MİK: 4-1000 µg/ml) ancak teikoplanine duyarlıdır (MİK: 0.5-1 µg/ml). İndüklenebilir ve kazanılmış bir dirençtir. Modifiye edilmiş hedefi D-ala-D-lak'dır. *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde görülür. Sadece Van B direncine özgü bir gen dışında diğer altı genin, *van A* kümesindeki genlerle %77 homoloji gösterdiği saptanmıştır. Van B direnç tipi, Van A tipi dirençte olduğu gibi *van R<sub>B</sub>*, *van S<sub>B</sub>*, *van H<sub>B</sub>*, *van A<sub>B</sub>*, *van V<sub>B</sub>*, *van Y<sub>B</sub>* ve *van Z<sub>B</sub>* adlı yedi farklı gen kümesi içerir (2). Direnç genleri genellikle kromozom üzerinde yerleşmiştir ve konjugasyon ile aktarı-

labilir, ancak bazı VRE vakalarında plazmidler üzerinde bulunabileceği de saptanmıştır (16, 17, 24, 26).

**Van C tipi direnç:** Van C tipi direnç; *Enterococcus gallinarum* (van C-1), *Enterococcus casseliflavus* (van C-2) ve *Enterococcus flavescens* (van C-3) suşlarında tespit edilen, vankomisine düşük düzeyde direnç olarak tanımlanır. A, B, D ve E tipi direnç genlerinden farklı olarak Van C tipi vankomisin direncini kodlayan genler endojeniktir ve yukarıda sözü geçen üç türe spesifik ligazlar içerir. 38 kDa'luk Van C membran proteinince oluşturulan, indüklenemez bir dirençtir. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-ser'dir. *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* suşlarının vankomisine duyarlılığı diğer enterokok suşlarından daha az olup, tüm *E. gallinarum* suşları vankomisine düşük düzeyde (MİK: 2-32 µg/ml) dirençli ve teikoplanine (MİK: 0.5-1 µg/ml) duyarlıdır. Tüm suşların yapsal olarak dirençli olmaları nedeniyle intrinsik bir dirençtir ve aktarılamaz (27).

**Van D tipi direnç:** Van D tipi direnç ise *E. faecium*'da tespit edilmiştir. Orta düzeyde vankomisin direnci (MİK: 16-64 µg/ml) ve düşük düzeyde teikoplanin direnci (MİK: 2-4 µg/ml) görülür. İndüklenebilir bu dirençten Van D membran proteini sorumludur. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-lak'dır. Glikopeptid direnci gen grubu olan *van D*, *van A* ve *van B* operonları ile benzer organizasyon gösterir (28).

#### Enterokoklarda Glikopeptid Direncinin Aktarım Yolları

Enterokoklarda kazanılan direnç, ya mutasyonlar ya da daha çok yabancı DNA kazanımı ile olur. Enterokokların, direnç genlerini diğer bakterilere aktararak yayabilmek için kullandıkları pek çok genetik aktarım sistemleri mevcuttur. Bu sistemler içerisinde; çok sayıda Gram pozitif (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*) türde de replike olabilen plazmidler, *E. faecalis* türleri arasında bazı durumlarda transfer sıklığı %100'e yaklaşan ve plazmid kopya sayısının belirlenmesinden sorumlu olup stabiliteyi oldukça yüksek olan seks feromon-cevap plazmidleri ile genetik materyal üzerinde

DNA'nın bir bölgesinden diğerine hareket edebilen, özelleşmiş, konjugatif tipte hareketli genetik elemanlar olan transpozonlar mevcuttur. Enterokok türleri arasında, yukarıda sözü geçen ve direnç genlerini içeren sistemler ile genetik değişimin her ne kadar transdüksiyonla olabildiği gösterilse de, en yaygın mekanizmanın konjugasyon ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra enterokoklarda; kromozomlar veya plazmidler üzerinde bulunan transpozonlar ile yeni bir konak bakteriye direnç geninin entegre olarak aktarıldığı da gösterilmiştir (18).

Enterokokların diğer patojenlere nazaran glikopeptid direnç genlerinin konjugal transferinde başarılı olmasının ve konjugasyon transfer sıklığının daha yüksek olmasının pek çok sebebi mevcuttur. Özellikle bazı *E. faecalis* plazmidlerinin konjugal transferi bir seks-feromon sistemi ile regüle edilir. Potansiyel alıcı hücreler, plazmid taşıyan verici hücreler için eşleşmeye spesifik bir cevap oluşturacak küçük peptid hormonları salgırlar. Hormon sentezinden 30 ila 40 dakika sonra verici hücrelerde eşleşmenin indüklenerek başlatıldığı gözlenmiştir. Bu esnada verici hücreler alıcı ile rastgele çarpışabilmek ve konjugasyon sıklığını arttırmak için yüzey adezyon proteinleri sentezleyerek eşleşme agregatları oluştururlar. Bu hormon salınımından sonra verici hücrelerdeki plazmid transfer sıklığının yaklaşık 1000 kat arttığı saptanmıştır (29).

Bunun dışında VRE'lerde yüksek seviyede glikopeptid direnç fenotipi gösteren genler çoğunlukla yüksek kopya sayısına ve yüksek stabiliteye sahip plazmidler ve plazmidlere entegre olmuş transpozonlar üzerinde bulunurlar. Plazmid veya kromozomlara entegre olmuş konjugatif transpozonlar aracılığıyla kazanılmış glikopeptid direnci de yine insersiyon dizileri içeren transpozonun başka bir konukçu DNA'ya entegre olabilmesi ile kolaylıkla aktarılabılır. Direnç genini içeren plazmidin stabilitesinin ve kopya sayısının yüksek olması da direncin sürdürülebilme ve transfer edilebilme olasılığını sağlamıştır (30, 31).

Enterokoklarda, yukarıda sözü edilen seksferomon sistemine sahip plazmidlerin bir kısmı aynı zamanda bakteriyeye beta hemoliz yeteneği kazandıran genlerini de taşır. Tuz, safra ve asitler gibi zorlu şartların bulunduğu organ ve dokularda yaşayabilme yetenekleri sayesinde hastane ortamlarındaki yoğun antibiyotik baskısına dayanabilirler (23). İşte böyle avantajlı konjugatif genetik elemanlara sahip enterokoklar ile direncin yayılımı özellikle son yıllarda tehlikeli boyutlara ulaşmış ve bu konu ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır.

Handwerger ve arkadaşları nozokomiyal bir *E. faecium* suşu ile yaptıkları çalışmada hem vankomisin direnci hem de beta hemoliz ile feromon cevaptan sorumlu 55 kb'lık bir pHKK100 konjugatif plazmidi izole etmişlerdir. Suşun yüksek konjugal transfer yeteneğini, kazanılmış plazmid üzerinde kodlu feromon cevap özelliği ve alıcı hücrenin salgıladığı eşey hormonlarına cevap olarak agregasyona uğramasıyla açıklamışlardır. Araştırmacılar, böyle kümeleşme şeklinde oluşan bir cevap ile konjugal transferin çok daha yüksek sıklıkla gerçekleşmesiyle sonuçlanacağını belirtmişlerdir (5).

Leclercq ve arkadaşlarının 1989 yılında *E. faecium* BM4165 ve *E. faecium* BM4178 suşları ile yaptığı çalışmada; nozokomiyal VRE'lerde aynı genetik elemanlar üzerinde sadece glikopeptid direnci değil, aynı zamanda çoklu antibiyotik direnç genlerinin de lokalize olabildiği gösterilmiştir. BM4164 suşunun sırasıyla vankomisin, tetrasiklin ve MLS antibiyotik direnci gösteren, transfer edilebilir, 34 kb'lık pIP819 plazmidi ve penisilin ile tetrasiklin direncinden sorumlu, 50 kb'lık pIP820 plazmidi içerdiği saptanmıştır. Yüksek seviyede glikopeptid (Van<sup>R</sup>, Tei<sup>R</sup>) direncinden her iki *E. faecium* suşunda da büyüklükleri sırasıyla 34 ve 40 kb olan pIP819 ve pIP821 plazmidleri sorumlu olduğu gösterilmiştir. pIP819 plazmidinin, daha önce farklı bir VRE suşundan izole ettikleri vankomisin direncinden sorumlu (29) pIP816 plazmidi ile neredeyse benzer olduğu fakat glikopeptid direnç geni yanında MLS antibiyotik direnç genlerini de içerdiği gösterilmiştir (4).

Bozdoğan ve Leclercq'in rapor ettiği başka bir çalışmada, vanA ve vanB tipi direnç in vitro olarak konjugasyonla, mobilize plazmidler veya plazmid üzerindeki transpozonlar ile ve kromozom aracılığıyla transfer edilebilmiştir. *E. faecium* ile yaptıkları çalışmada, 60 kb'dan büyük bir plazmid aracılı vankomisin ve streptogramin direnci saptanmıştır. Bakteride vankomisin (MİK >128 µg/ml), eritromisin (MİK >128 µg/ml) ve tetrasiklin direnci gösterilmiştir. Aynı büyük plazmid üzerinde *erm AB*, *sat A* ve *van B* genlerinin lokalize olduğu ve bu genlerin glikopeptid ve streptogramin direncinden de sorumlu olduğunu belirlemişlerdir (9).

Heaton ve arkadaşlarının bir çalışmasında, *E. faecium* R7 izolatu ile çalışılmış ve bu suşta vankomisin direncinin konjugal transferi ile ilişkili iki farklı plazmid tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre pHKK702; 41 kb'lık ve glikopeptid direncinden sorumlu, Tn1546 benzeri bir eleman içeren, nonkonjugatif bir plazmid ve pHKK703 ise 55 kb'lık, *E. faecalis* seks feromon cevap plazmidi olan pCF10'a benzer, pHKK702'nin konjugasyonundan sorumlu bir plazmidir. pHKK702'nin pHKK703'e konjugal aktarımı sonunda oluşan pHKK701 plazmidinin ise, her iki plazmid DNA'yı da kapsayan yaklaşık 92 kb'lık hibrit bir plazmid olduğu tespit edilmiştir. pHKK701, Van A tipi glikopeptid direnci sağlayan pHKK702 plazmidine ait Tn5506 transpozonunun aktarımı ile oluşturulmuştur. Heaton ve arkadaşlarına göre, vankomisin direncindeki yayılımın artmasındaki nedenlerden biri de *E. faecium*'da yüksek seviyede indüklenebilir glikopeptid direnci gösteren Van A fenotipi içerikli Tn1546 transpozonunun tanımlanmasıdır (4). Araştırmacılar, Enterokoklar arasındaki vankomisin direnç elemanlarının yayılımını; Tn1546 benzeri elemanların konjugatif mobilizasyonu ile gerçekleştirdiğini açıklamışlardır (7).

#### Glikopeptid Direncinin Enterokoklardan Diğer Patojenlere Hızlı Yayılımı

Enterokoklarda glikopeptid direncinin sadece tür içi ve türler arası değil farklı cinslerdeki patojenlere

de aktarılabildiği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Ne yazık ki direnç genlerinin transfer yetenekleri sadece laboratuvar ortamında değil, aynı zamanda hastane ortamlarında çeşitli vakalardan izole edilen vankomisine dirençli diğer türler ve cinslerin varlığı ile de gösterilmiştir.

Nozokomiyal kökenli *E. gallinarum* ET193 izolatu ile yapılan bir çalışmada, Van A fenotipi gösteren van A tipi direnç genlerinin varlığı tespit edilmiş ve PCR ile yapılan dizileme sonucunda Tn1546 ile ilişkili olduğu saptanan, konjugasyon yeteneğine sahip, 10.8 kb'lık Tn1546'ya benzer bir transpozonun varlığı gösterilmiştir. Yapılan konjugasyon çalışmalarında direnç genlerinin *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerine aktarılabildiği görülmüştür. Normalde Van C fenotipi ile düşük seviyede intrinsik direnç göstermesi beklenen *E. gallinarum* türünde van A tipi direnç genleri ile karşılaşılması, vankomisin direnci ile ilgili bu genin türler arasında kolaylıkla aktarılabildiğine ve yayılımın ne denli tehlikeli boyutlara ulaştığına işaret etmektedir (32).

Bazı araştırmalarda, van A geninin enterokoklardan *Staphylococcus aureus*'a konjugatif transferinin in vitro olarak yapılabildiği gösterilmiştir. 2002 yılında ise Amerikada bir hastada ilk kez  $\geq 32$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  vankomisin MİK değerine sahip enfeksiyon etmeni vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşunun izole edildiği rapor edilmiştir. İzolatın glikopeptid MİK profiline sahip olduğu ve enterokokal kaynaklı vanA vankomisin direnç geni taşıdığı belirtilmiştir. Bu da vankomisin direncinin sadece stafilokoklara değil diğer cinslere de aktarılabileceğini göstermiş ve tehlikenin boyutlarına işaret etmiştir (33).

Sonuç olarak, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de antibiyotiklerin yaygın ve kontrolsüz kullanımı, dirençli bakteri suşlarının yararına bir seleksiyon oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar, ülkemizden izole edilen klinik kökenli *Enterococcus* cinsi bakterilerde antibiyotiklere karşı direncin artışına işaret etmektedir. Özellikle 1980'lerden sonra antibiyotiklere karşı değişik tiplerde direnç

mekanizmaları geliştiren ve enfeksiyon tedavisinde mevcut antibiyotik kullanımını kısıtlayan enterokoklarda direncin genetiği araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Direncin yayılımında insanlar için bu denli tehlike yaratan VRE vakalarında direncin genetik temelini daha iyi anlaşılması ile antibiyotik kullanımını kontrol altına alıp, hızlı bir direnç patlamasının önüne geçmek mümkün olabilecektir.

#### KAYNAKLAR

1. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, and George RC. Vancomycin resistant enterococci. Letter. Lancet. 1988; 1: 57-58.
2. Arthur M, and Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in Enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37: 1593-1571.
3. Zervos MJ, Mikesell TS, and Schaberg DR. Heterogeneity of plasmids determining high-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 1986; 30: 78-81.
4. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, and Courvalin P. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 1989; 33: 10-15.
5. Handwerker S, Pucci MJ, and Kolokathis A. Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus faecium* 228. Antimicrob Agents Chemother. 1990; 34: 358-360.
6. Signoretto C, Boaretti M, and Canepari P. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the low-affinity penicillin binding protein of *Enterococcus faecalis*. FEMS Microbiol Letters, 1994; 123: 99-106.
7. Heaton MP, Discotto LF, Pucci MJ, and Handwerker S. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a Van A plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. Gene. 1996; 171: 9-17.
8. Woodford N, Chadwick PR, Morrison D, and Cookson BD. Strains of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* can alter their van genotypes during an outbreak. J Clin Microbiol. 1997; 36: 2966-2968.



9. Bozdoğan B, and Leclercq R. Plasmid-mediated coresistance to streptogramins and vancomycin in *Enterococcus faecium* HM103. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2097-2098.
10. Son R, Nimita F, Rusul G, Nasreldin E, Samuel L, and Nishibuchi M. Isolation and molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Malaysia. *Letters in Appl Microbiol.* 1999; 29: 118-122.
11. Simjee S. and Gill M.J. 1997. Gene transfer, gentamicin resistance and *Enterococci*. *J Hospital Infect*, 36; 249-259.
12. Basustaoglu A, Aydogan H, Beyan C, Yalcın A, and Unal S. First glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(1): 1-2.
13. Colak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, and Nordmann P. First outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 397-401.
14. Coleri A, Cokmus C, Ozcan B, Akcelik M, and Tukul C. Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species. *J Gen Appl Microbiol.* 2004; 50: 213-219.
15. Yenişehirli G, Bulut Y. Antibiotic resistance of *Enterococci* isolated from an intensive care unit. *Türkiye Klinikleri, J Med Sci.* 2006; 26: 477-482.
16. Handwerger S, Perlman DC, Altarac D, and McAuliffe V. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of *Enterococci*. *Clinical Infec Dis.* 1992; 14: 655-661.
17. Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, and Keane CT. Incidence and detection of multi-drug-resistant *Enterococci* in Dublin hospitals. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 150-156.
18. Çöleri, A. Türkiye kaynaklı klinik *Enterococcus*'ların antibiyotik dirençliliği. Ankara Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans, Ankara. Tezi. 2002; 1-93.
19. Murray BE. Vancomycin-resistant Enterococcal infections. *The New England J Medic.* 2000; 342: 710-721.
20. Guardabassi L, and Dalsgaard A. Occurrence, structure, and mobility of TN1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 984-990.
21. Aktaş O. Enterokok türlerinde glikopeptid, penisilin ve yüksek düzey aminoglikozid dirençlerinin araştırılması. SSK Eğitim İzmir Hastanesi (Uzmanlık tezi), 1999; 1-32.
22. Ligozzi M, Lo Cascio G, and Fontana R. *van A* gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(8): 2055-2059.
23. Gutmann L, Al-Obeid S, Billot-Klein D, Guerrier ML, and Collatz E. Synergy and resistance to synergy between  $\beta$ -lactam antibiotics and glycopeptids against glycopeptide resistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1994; 38(4): 824-829.
24. Hanrahan J, Hoyen C, and Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1349-1351.
25. Tremlett CH, Brown DFJ, and Woodford N. Variation in structure and location of *van A* glycopeptide resistance elements among enterococci from a single patient. *J Clinic Microbiol.* 1999; 37: 818-820.
26. Leclercq R, and Courvalin P. Resistance to h-glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis.* 1997; 24; 545-554.
27. Vincent S, Knight RG, Green M, Sahn DF, and Shlaes DM. Vancomycin Susceptibility and Identification of Motile *Enterococci*. *J Clinic Microbiol.* 1991; 29: 2335-2337.
28. Perichon, B., Casadewall, B., Reynolds, P. and Courvalin, P. 2000. Glycopeptide Resistant *Enterococcus faecium* BM4416 Is a Van D-Type Strain with an Impaired D-Alanine:D-Alanine Ligase. *Antimicrob. Agents Chemo.* 44; 1346-1348.
29. Leclercq R, Derlot E, Duval J, and Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med Microbiol.* 1988; 9: 275-302.
30. Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell.* 1993; 73: 9-12.
31. Dunny GM, Leonard BAB, and Heberg PJ. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*:

- interbacterial and host-parasite chemical communication. *J Bacteriol.* 1995; 177: 871-876.
32. Camargo LBC, Barth AL, Pilger K, Seligman BGS, Machado ARL, and Darini ALC. *Enterococcus gallinarum* carrying the *van A* gene cluster: first report in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004; 37: 1669-1671.
33. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin in United Nations, Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51(26): 565-567.
34. Patel R. Vancomycin-resistant enterococci in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 1999; 4: 271-280.  
[www.earss.rivm.nl](http://www.earss.rivm.nl). The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) internet sitesi, erişim tarihi 26.06.2008.