

# Giresun İlinde İzole Edilen Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Klinik İzolatlarının Moleküler Özellikleri<sup>§</sup>

Mehtap ÜNLÜ SÖĞÜT\*<sup>Ⓞ</sup>, Şule KIRCA\*\*<sup>Ⓞ</sup>, Selma KELEŞ ULUDAĞ\*\*\*, Gökçen DİNÇ\*\*\*\*<sup>Ⓞ</sup>, Alper ÇİFTÇİ\*\*\*\*\*<sup>Ⓞ</sup>

\*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Samsun

\*\*Giresun Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Giresun

\*\*\*Dr. Ayten Bozkaya Spastik Çocuklar Hastanesi, Bursa

\*\*\*\*Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

\*\*\*\*\*Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

## ÖZ

**Amaç:** Son yıllarda nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan *Enterococcus faecium* izolatlarının artan çoklu antimikrobiyal direnç gelişimi, özellikle virulans faktörleri gibi birçok özelliğinin daha ayrıntılı incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Çalışmada, vankomisine dirençli *E. faecium* (VRE<sub>fm</sub>) izolatlarının virulans faktörlerinin, direnç genlerinin ve genotipik benzerliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Giresun Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunan 37 adet *Enterococcus faecium* izolatı incelenmiştir. İzolatların tanımlaması ve *in vitro* antimikrobiyal duyarlılık testleri Vitek-2 otomatize sistemi (BioMérieux, ABD) ile yapılmıştır. Vankomisine ve teikoplanine direnç durumları sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir. Vankomisin direnç genleri *vanA*, *vanB* ve virulans genleri *esp*, *gelE*, *hyl*, *cylA* ve *asaI* genleri PCR ile araştırılmıştır. Biyofilm üretimi fenotipik olarak Kongo Red Agar (CRA) yöntemi ile belirlenmiştir. Klonal ilişkinin belirlenmesi için RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** İzolatların tümü vankomisin ve teikoplaninin yanı sıra tetrasiiklin, norfloksasin, eritromisin, siprofloksasin, ampisiline dirençli, linezolid duyarlı bulunmuştur. Biyofilm üretimi tüm izolatlarda gözlenmiştir. İzolatların tümünün *vanA* geni ve vankomisin-teikoplanin direnci ile karakterize *vanA* fenotipine sahip olduğu görülmüştür. *esp*, *gelE* ve *hyl* genleri sırasıyla %62,2, %2,7 ve %27 oranlarında bulunmuştur, *vanB*, *asaI* ve *cylA* genleri ise hiçbir izolatta saptanmamıştır. RAPD-PCR ile genotipleme analizinde izolatların 3 ana RAPD grubu belirlenmiştir. *esp* geni taşıyan 23 izolatın tamamı dominant olan RAPD grubunda yer almaktadır. Genotipik olarak izolatların yakınlık derecesi değerlendirildiğinde yakın gruplar arasında homojenite gözlenmiştir.

**Sonuç:** VRE<sub>fm</sub>'nin spesifik klonları ve virulans genleri arasında bir ilişki bulunamamıştır, ancak izolatlarda *esp* oranının yüksek oluşu bu genin bakterinin patojenitesi üzerinde etkili olduğunu düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Vankomisine dirençli *E. faecium*, virulans genleri, moleküler

## ABSTRACT

**Molecular Characterization of Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Giresun City**

**Objective:** Recently, isolates of *Enterococcus faecium* have been the leading cause of nosocomial infections worldwide and have at the same time increased multimicrobial resistance which necessitated investigation of many characteristics especially virulence factors in detail for infection control and prevention. The aim of this study was to investigate the virulence factors, resistance genes and genotypic similarities in vancomycin resistant *E. faecium* (VRE<sub>fm</sub>) isolates.

**Material and Methods:** The study included 37 *Enterococcus faecium* isolates obtained from various clinical specimens in microbiology laboratory of Giresun State Hospital. The identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility tests of the isolates were performed using Vitek 2 automated system (BioMérieux, US). The susceptibility to vancomycin and teicoplanin were investigated using broth microdilution method. The presence of vancomycin resistance genes *vanA*, *vanB* and virulence genes *esp*, *gelE*, *hyl*, *cylA* and *asaI* were determined by PCR. Biofilm formation was also tested phenotypically by Congo Red Agar method. RAPD-PCR was performed to determine the clonal relationship among the isolates.

**Results:** All of the isolates were resistant to vancomycin, teicoplanin, tetracycline, norfloxacin, erythromycin, ciprofloxacin, ampicillin and susceptible to linezolid. The production of biofilm was observed in all isolates. All of the isolates had the *vanA* gene and the *vanA* phenotype characterised by resistance to vancomycin and teicoplanin. *esp*, *gelE* and *hyl* genes were detected in 62.2%, 2.2% and 27% of all the isolates, respectively. *vanB*, *asaI* and *cylA* genes were not detected in any of the isolates. Genotyping analysis of the isolates by RAPD-PCR identified three main RAPD groups. All of 23 isolates that carried the *esp* gene also belonged to the dominant RAPD group. When genotypical relationships of all the isolates was evaluated, homogeneity was observed between nearly similar groups.

**Conclusions:** No relationship was found between specific clones and virulence genes of VRE<sub>fm</sub>; yet high positivity of the isolates for *esp* gene suggests the impact of this gene on bacterial pathogenicity.

**Keywords:** Vancomycin-resistant *E. faecium*, virulence genes, molecular epidemiology

Alındığı tarih: 06.06.2018

Kabul tarihi: 02.07.2018

<sup>§</sup> Bu çalışma, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi'nde (4-7 Haziran 2014, Ankara) poster bildiri olarak sunulmuştur.

## Yazarların ORCID bilgileri:

Mehtap Ünlü Söğüt 0000-0001-9461-6428 Şule Kurca 0000-0003-4504-6304  
Gökçen Dinç 0000-0002-9184-5003 Alper Çiftçi 0000-0001-8370-8677

## GİRİŞ

Enterokoklar insan ve hayvanların ağız florası, intestinal flora ve dişi genital sisteminin doğal üyeleri olmakla birlikte, fırsatçı patojen konumundadırlar<sup>(1)</sup>. Uç sıcaklıklarda (5-65°C), geniş pH aralığında (4.5-10.0) ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında üreyebilmeleri yayılmalarını kolaylaştırır<sup>(2)</sup>. En sık görülen enterokok türleri *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olup, başlıca üriner sistem enfeksiyonlarına, intra-abdominal, intra-pelvik apselere ve kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olurlar<sup>(1)</sup>. Üriner sistem enfeksiyonlarında ikinci, nozokomiyal bakteriyemilerde üçüncü sırada etken olarak karşımıza çıkarlar. En sık izole edilen tür olan *E. faecalis* artmış virulansa sahipken son yıllarda prevalansı artmakta olan *E. faecium* çoklu ilaç direnci gösterir<sup>(3)</sup>.

Enterokoklar, virulans özelliklerini ya da antibiyotik direnç genlerini kodlayan ekstrakromozomal elementleri kazanıp aktararak antimikrobiyal direncin hızlı yayılımında ve persistansında önemli rol oynarlar<sup>(4,5)</sup>. Çeşitli antimikrobiyal ajanlara ve kullanılan antibiyotiklere kazanılan direncin tedavi seçeneklerini sınırlamasıyla yüksek düzey morbidite ve mortalite görülür<sup>(4,6)</sup>. Vankomisine dirençli enterokok (VRE) insidansındaki artışın vankomisinin yaygın kullanımıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Enterokoklar da dokuz vankomisin direnç fenotipi (*VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanM*, *VanN*) bulunmaktadır; *VanA* en baskın fenotiptir, yüksek düzey vankomisin ile teikoplanin direnci sergiler ve başlıca vankomisine dirençli *E. faecium* (VRE<sub>fm</sub>) ile ilişkilidir<sup>(6)</sup>.

Enterokoklarda bazı virulans faktörleri; agregasyon faktörü, jelatinaz, sitolizin (sitotoksik), enterokok yüzey proteini (*esp*) ve hyaluronidazdır (*hyl*)<sup>(7)</sup>. Virulans faktörleri bakterinin konak dokularına adezyon, kolonizasyon ve invazyonunu sağlayarak patojenitesine katkıda bulunur<sup>(8)</sup>.

VRE<sub>fm</sub> suşları çoğunlukla *esp* veya *hyl* taşır<sup>(6)</sup>. Agregasyon faktörü, plazmid üzerinde taşınan asal geni tarafından kodlanan bir glikoproteindir. Nötrofil, renal tubuler hücreler ve kalp endokard hücreleri gibi çeşitli hücrelere bakteriyel aderansı artırır<sup>(7,9)</sup>. Ayrıca konjugasyon sırasında bakteriyel agregasyona aracılık ederek plazmid alışverişini kolaylaştırır, bakterilerin yüzeylerde tutunarak kümeleşmesini sağlayarak biyofilm oluşumuna yardımcı olur<sup>(3)</sup>. Jelatinaz, kromozomal *gelE* tarafından kodlanır, ekstraselüler çinko-endopeptidaz olup, jelatini, kollajeni ve küçük peptidleri parçalayarak<sup>(7)</sup> bakterinin konak dokularına yayılmasını kolaylaştırır<sup>(10)</sup>, biyofilm oluşumu ile de ilişkilidir<sup>(2)</sup>. Sitolizin beta-hemolitik olup, hem prokaryotlar hem de ökaryotlara etkilidir, diğer Gram pozitif bakteriler üzerine bakterisidal etki gösterir<sup>(2,9)</sup>. Sitolizin üretiminin enterok enfeksiyonunu şiddetlendirdiği, hayvan modellerinde endokardit ve endoftalmiyi artırdığı belirlenmiştir. Sitolizin genleri plazmid üzerinde taşınabildiği gibi bakteri kromozomuna entegre olarak da bulunabilir<sup>(7)</sup>. Enterokok yüzey proteini kromozomal *esp* tarafından kodlanır; epitel hücrelerine adezyon, üriner sistemde artmış virulans, kolonizasyon ve persistansla ilişkili<sup>(6,7)</sup> olup, aynı zamanda biyofilm oluşumuna katkıda bulunur<sup>(6)</sup>. Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların antibiyotiklere ve fagositoza yüksek düzeyde direnç göstermelerini sağladığından biyofilm üretiminin incelenmesi önemlidir<sup>(11)</sup>. Hyaluronidaz kromozomal *hyl* geni tarafından kodlanır<sup>(7)</sup> ve doku hasarına yol açar. Bağ dokusundaki mukopolisakkariti depolimerize ederek bakterinin ve toksinlerinin dokularda yayılmasını kolaylaştırır<sup>(2)</sup>.

Enterokok izolatlarının ayırt edilmesinde epidemiyolojik çalışmalarda son yıllarda çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan bazıları; farklı antibiyotik direnç profillerine dayalı antibiyotiplendirme, genotiplemede rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), değişken alanlı jel elektroforezi

(PFGE), ribotipleme, amplifiye fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve multilokus dizi analizi (MLST)'dir<sup>(12)</sup>. Bu yöntemler arasında RAPD kolay uygulanabilir, hızlı ve düşük maliyetli bir yöntemdir<sup>(13)</sup>.

Çalışmanın amacı çeşitli klinik örneklerden elde edilen vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarının virulansında rol oynayan faktörlerin, direnç profillerinin ve genotipik benzerliklerinin araştırılmasıdır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

**Bakteri İzolatları:** Çalışma kapsamında, Giresun Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve fenotipik olarak vankomisine dirençli bulunan 37 adet *E. faecium* izolatu kullanılmıştır. *E. faecium* izolatları, perirektal sürüntü (n=31), idrar (n=4), kan (n=1) ve aspirasyon sıvısı (n=1) izolatları olup Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi (n=10), Dâhiliye Yoğun Bakım Ünitesi (n=6), Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi (n=6), Gastroenteroloji Servisi (n=2), Anestezi ve Reanimasyon (n=4), Nöroloji Servisi (n=5) ve Koroner Yoğun Bakım (n=4) ünitelerinden izole edilmiştir. İzolatlar Vitek-2 (BioMérieux, ABD) otomatize sistemi ile tür düzeyinde tanımlanarak PCR yöntemiyle de genotipik olarak doğrulanmıştır<sup>(14)</sup>. Çeşitli antibiyotiklere (linezolid, gentamisin, levofloksasin, teikoplanin, tetrasiklin, streptomisin, norfloksasin, nitrofurantoin, eritromisin, siprofloksasin, ampisilin ve penisilin G) in vitro duyarlılık testleri Vitek-2 otomatize sistemiyle yapılmıştır. Ayrıca vankomisin ve teikoplanin duyarlılığının belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon testi uygulanmış, sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre değerlendirilmiştir.

**Biyofilm Oluşumu:** Biyofilm üretiminin belirlenmesi için Kongo Red Agar (CRA) kullanılmıştır. CRA üzerindeki siyah koloniler biyofilm

üretiminde pozitif, pembe ve renksiz koloniler ise biyofilm üretimi için negatif olarak değerlendirilmiştir<sup>(15)</sup>.

**Vankomisin Direnç ve Virulans Genlerinin Saptanması:** Daha önceden tanımlanmış olan PCR protokolü kullanılarak vankomisin direncinden sorumlu genler (*vanA*, *vanB*) araştırılmıştır<sup>(16)</sup>. *esp*, *gelE*, *hyl*, *cylA* ve *asal* virulans genlerini belirlemek için Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> tarafından tanımlanan primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

**RAPD-PCR Amplifikasyonu:** RAPD-PCR analizi M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') kullanılarak gerçekleştirilmiştir<sup>(17)</sup>. RAPD profilleri arasındaki benzerlik Dice benzerlik katsayısı, CHEF-DR® III, Quantity One® Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD) programı ve "Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA)" algoritması kullanılarak çizilen dendrogram üzerinde, Dice %70 benzerlik eşik değeri ile oluşturulan gruplarla tanımlanmıştır.

## BULGULAR

Çalışma kapsamında incelenen *E. faecium* izolatlarının tümünün biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *E. faecium* izolatlarının antibiyotik direnç (R)/duyarlılık (S) oranları Tablo 1'de gösterilmiştir. İzolatların tümü vankomisin ve teikoplaninin yanı sıra tetrasiklin, norfloksasin, eritromisin, siprofloksasin, ampisiline dirençli, linezolide duyarlı bulunmuştur. Vankomisin ve teikoplanin antibiyotikleri kullanılarak uygulanan sıvı mikrodilüsyon testi sonucunda, tüm izolatlar için vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri  $\geq 256 \mu\text{g/ml}$  olarak belirlenmiştir.

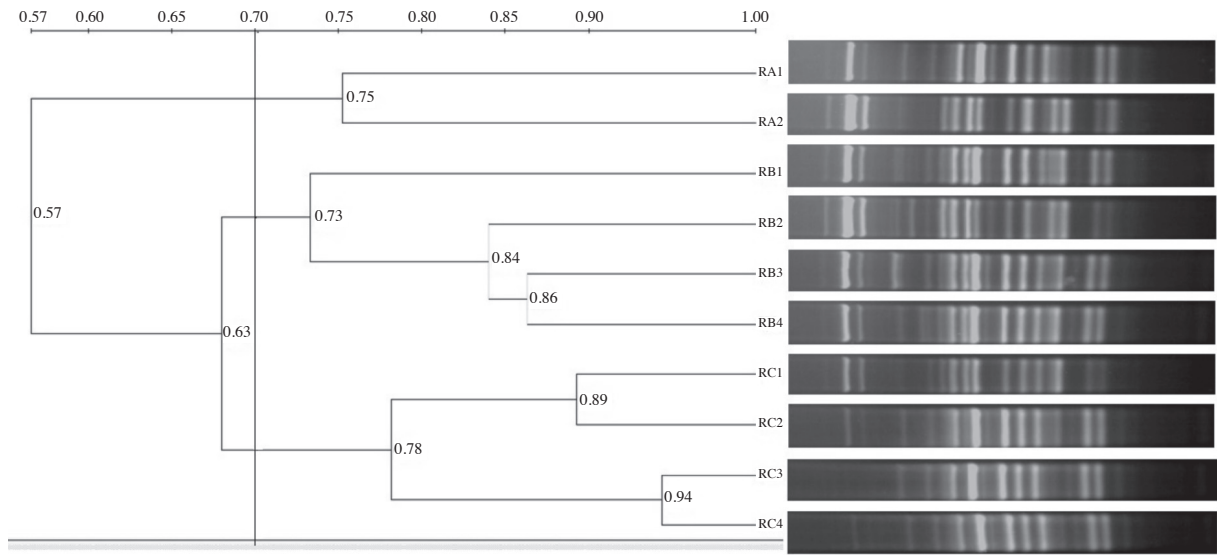
*E. faecium* izolatlarına ait vankomisin direnç ve virulans genlerinin sonuçları Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 1.** *Enterococcus faecium* izolatlarının antibiyotik direnç/duyarlılık oranları.

Antibiyotikler	Dirençli (%)	Duyarlı (%)
Gentamisin	10 (27.03)	27 (72.97)
Levofloksasin	31 (83.79)	6 (16.21)
Streptomisin	10 (27.03)	27 (72.97)
Teikoplanin	37 (100)	0 (0)
Tetrasiklin	37 (100)	0 (0)
Linezolid	0 (0)	37(100)
Norfloksasin	37 (100)	0 (0)
Nitrofurantoin	23 (62.16)	14(37.84)
Eritromisin	37 (100)	0 (0)
Siprofloksasin	37 (100)	0 (0)
Ampisilin	37 (100)	0 (0)
Penisilin G	37 (100)	0 (0)

**Tablo 2.** *Enetrococcus faecium* izolatlarının vankomisin direnç ve virulans genleri.

Vankomisin Direnç Geni/Virulans Geni	n (%)
<i>van A</i>	37 (%100)
<i>van B</i>	0
<i>gele</i>	1 (%2.7)
<i>asa1</i>	0
<i>Hyl</i>	10 (27.03)
<i>Esp</i>	23 (%62.16)
<i>cylA</i>	0



**Şekil 1.** *Enterococcus faecium* izolatlarına ait RAPD profilleri ve UPGMA ile oluşturulan dendrogram.

Biyofilm üretimi tüm izolatlarda gözlenmiştir. İzolatların tümünün *vanA* geni ve vankomisin-teikoplanin direnci ile karakterize *vanA* fenotipine sahip olduğu görülmüştür. *esp*, *gelE* ve *hyl* genleri sırasıyla %62.2, %2.7 ve %27 oranlarında bulunmuş, *vanB*, *asa1* ve *cylA* genleri ise hiçbir izolatta saptanmamıştır.

RAPD-PCR sonucunda izolatların 10 farklı RAPD profiline sahip olduğu görülmüştür. Yüzde 70 benzerlik esas alınarak 3 ana RAPD profil grubu (A-C) belirlenmiştir (Şekil 1). İzolatlar 3 ana tipte temsil edilmiştir: Tip A (n=2), tip B (n=4) ve Tip C (n=31). Genotipik olarak izolatların yakınlık derecesi değerlendirildiğinde,

*E. faecium* izolatlarında yakın gruplar arasında homojenite gözlenmiştir. *esp* geni taşıyan 23 izolatın tamamı RAPD-PCR genotiplendirmede tip C'de yer almaktadır.

## TARTIŞMA

Enterokoklar gastrointestinal ve genital sistemin florasında doğal olarak bulduklarından yol açtıkları enfeksiyonlar çoğunlukla endojen kaynaklıdır. Bununla birlikte, hastadan hastaya direkt temas, hastane personeli aracılığı ve eşyalardan indirekt temas yoluyla da bulaş gerçekleşmektedir<sup>(18)</sup>. Enterokokların virulansına katkıda bulunan çeşitli genler vardır fakat virulans fak-

törleri ile patojenite ilişkisi henüz tam olarak bilinmemektedir<sup>(3,10)</sup>. *E. faecium*, horizontal gen transferiyle çoklu ilaç direncinden dolayı önemi gitgide artan bir patojendir<sup>(12)</sup>. Klasik virulans faktörlerinden olmasa da çoklu ilaç direnci, bakterinin yaşamda kalmasına ve çoğalmasına olanak sağlar<sup>(19)</sup>. Glikopeptidlere olan artan direnç tedavi başarısızlığı ve mortaliteyi artırmaktadır<sup>(2)</sup>. Artan antibiyotik direnci her zaman virulans faktörlerindeki artışla ilişkili değildir. Bu durum mikroorganizma zindeliğinin korunmasına yönelik olup, bakterinin antibiyotik direnci kazanırken virulans faktörlerini kaybetmesiyle ya da tersiyle gerçekleşir<sup>(20)</sup>. Direnç ve virulans faktörlerinin kazanılması mikroorganizmanın zindeliğini baskılayabilir. Özellikle fırsatçı patojenlerde çoklu direnç gösteren suşların sınırlı virulans özelliklerine sahip olduğu belirtilmiştir<sup>(3)</sup>. Vankomisine duyarlı suşlarda dirençli suşlara göre daha yüksek oranda virulans faktörlerinin bulunduğu da çalışmalarla gösterilmiştir<sup>(20)</sup>.

Biyofilm üretiminin enterokokların patojenitesinde önemli rolü vardır<sup>(11)</sup>. Biyofilm üretimi ve antibiyotik direnci arasında, biyofilm üreten suşların antibiyotiklere daha dirençli olduğu şeklinde bir ilişki olduğu belirlenmiştir<sup>(4)</sup>. Biyofilm oluşumunun spesifik bir gene bağlı olmadığı, bu fenotipin çeşitli genlerin birlikte çalışmasına bağlı olarak multifaktöriyel olduğu bildirilmiştir. Biyofilm oluşumunda etkin olan faktörlerden biri bakterinin sahip olduğu virulans genleridir. Bu genlerin birlikte çalışmalarının biyofilm oluşumunu desteklediği, genlerde ortaya çıkan mutasyonların ise bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğini azalttığı sanılmaktadır<sup>(3)</sup>.

*esp* genine sahip olan *E. faecium* suşlarında bu gene sahip olmayanlara nazaran konjugasyonun daha sık gerçekleştiği ve ampisilin, siprofloksasin ve imipenem daha dirençli oldukları görülmüştür<sup>(2,21)</sup>. *gelE* genine sahip bazı suşların jelatinaz üretmediği, *gelE* geninin ifadenmesinde başka genlerin de rolü olabileceği belirtil-

miştir. Bu durum enterokok virulansının açıklanmasını daha da güçleştirmektedir<sup>(3)</sup>. *esp* ve *gelE*'nin biyofilm oluşumu ile ilişkisi tartışmalıdır; bazı araştırmacılar bu genlerin biyofilm oluşumuna katkısı olmadığını savunurken bazıları aksini iddia etmektedirler<sup>(3,22-24)</sup>.

*VREfm* enfeksiyonlarının yayılımının önlenmesi ve epidemiyolojisinin anlaşılmasında moleküler takip önemlidir<sup>(25)</sup>. PFGE enterokokların tiplendirilmesinde altın standarttır ve VRE salgınlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesinde yoğun olarak kullanılan bir yöntemdir<sup>(26)</sup>. Hızlı ve maliyet etkin olması nedeniyle klonal ilişkinin gösterilmesinde RAPD de oldukça sık kullanılmaktadır. Bu yöntemin uzak ilişkili enterokok izolatlarının ve diğer Gram pozitif bakterilerin epidemiyolojik surveyansında kullanılabileceği bildirilmiştir<sup>(12)</sup>. Van den Braak ve ark.<sup>(27)</sup> VRE klinik izolatlarının genotiplendirilmesinde, RAPD ve PFGE'yi karşılaştırdıkları çalışmalarında birbiriyle uyumlu sonuçlara ulaşmışlar ve her iki yöntemin birbirlerinin alternatifi olabileceğini vurgulamışlardır. Aktaş ve ark.<sup>(18)</sup> 13 *VREfm* izolatı ile yaptıkları çalışmada, suşların tümünün *vanA* fenotipinde olup, vankomisin, teikoplanin ve yüksek düzey streptomisin direnci gösterdiğini ve yüksek düzey gentamisin direncinin ise %53 oranında görüldüğünü, linezolid ve nitrofurantoinin etkili antibiyotikler olduğunu bildirmişlerdir. RAPD-PCR yöntemi ile 4 profil saptamışlardır. Gülhan ve ark.<sup>(4)</sup> da RAPD-PCR ve antibiyotiplendirme ile *E. faecium* izolatlarının genotipik ve fenotipik olarak çeşitliliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda, RAPD analizi ile 10 farklı profil elde edilmiştir. İzolatların tamamı *vanA* (+) olup, *vanA* fenotipi sergilemiş, in vitro etkili antibiyotiğin henüz yaygın kullanılmayan linezolid olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, önceki çalışmalara<sup>(4,18)</sup> benzer şekilde poliklonal bir yayılım görülmektedir. Ancak RAPD profillerinin %70 benzerlik eşik değeri alınarak yapılan gruplan-

dırmasında *esp* geni taşıyan izolatların tamamının dominant tip olan tip C (n=31) içinde yer alması dikkat çekicidir. Bu durumda *esp* geni taşıyan izolatların genetik özellikler bakımından homojenite gösterdiğini söylenebilir. Salgınlardan tek bir klonun sorumlu olabileceği gibi genellikle glikopeptid dirençli enterokokların genetik çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir<sup>(25)</sup>. Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> 135'i vankomisine dirençli toplam 271 *E. faecium* izolatını inceledikleri çalışmada, *esp* gen pozitifliği ile vankomisin direnci arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir. İzolatlarımızın tümünün vankomisine dirençli olması ve *esp* oranının da nispeten yüksek oluşu bu genin bakterinin virulansında önemli olduğunu düşündürmektedir. VREfm suşlarında *esp* oranı çalışmamızda %62.2 olarak saptanırken, Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> %77, Comerlato ve ark.<sup>(3)</sup> %80, Kang ve ark.<sup>(6)</sup> da %80 olarak belirlemişlerdir. Comerlato ve ark.<sup>(3)</sup> vankomisine dirençli *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarının PFGE ile belirledikleri alt klonları ve virulans faktörleri arasında bir ilişki belirleyememişlerdir. İzolatlar birbirinden farklı virulans profilleri sergilemişlerdir. Vankomisin direncinin virulans faktörlerinde bir artışa yol açmadığını, VREfm in bazı klonlarının yüksek oranda *esp* pozitifliği gösterdiğini ve bu genin virulans sürecinde önemli rolü olabileceğini belirtmişlerdir.

Thierfelder ve ark.<sup>(28)</sup> hastanelerinde 14 günlük bir sürede ortaya çıkan VREfm salgınında izole ettikleri suşların PFGE sonuçlarına göre poliklonal olduğunu ve tek bir merkez kökenli suşların epidemiyolojisinin karmaşık olduğunu ayrıca VREfm enfeksiyonu olan dört hastadan izole edilen suşların *esp* pozitif olduğunu görmüşlerdir. Diğer çalışmalarda da, hastane ortamında yaygın olan bazı klonların *esp* ile bağlantılı olduğu ve buradan yola çıkarak *esp*'nin bakterinin virulans sürecindeki katkısının büyük olduğu öne sürülmüştür<sup>(3,21)</sup>. Routs ve ark.<sup>(25)</sup> tarafından glikopeptid dirençli *E. faecium* salgın suşlarının tamamında *esp* pozitifliği saptanmış ve *esp*'nin

artmış virulansla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. *E. faecium* izolatlarının glikopeptid direncinin ortaya çıkışından önce de *esp* genine sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur<sup>(25)</sup>.

Baylan ve ark.<sup>(9)</sup> üriner enterokok izolatlarında antibiyotik direnç durumları ve virulans faktörlerini araştırdıkları çalışmalarında, *E. faecium* suşlarında *hyl* pozitifliğinin anlamlı derecede yüksek (%38.7), jelatinaz aktivitesinin düşük (%3.2) ve *esp* pozitifliğinin %6.5 oranında olduğunu saptamışlardır. *asaI* gen pozitifliği ve hemolizin üretimini belirlememişlerdir. Çalışmamızda, *hyl* (%27), *gelE* (%2.7), *esp* (%62.2) olarak saptanırken; *asaI* ve *cylA* genleri belirlenmemiştir. *gelE*, *asaI* ve *cylA*'nın *E. faecium*'da ender rastlanılan genler olduğu bildirilmiştir<sup>(29)</sup>. İzolatlarımızın hepsinde biyofilm üretimi gözlemlendiğinden *asaI*, *esp* ve *gelE*'nin biyofilm oluşumuna katkısı belirlenmemiştir.

Vankerckhoven ve ark.<sup>(7)</sup> enterokok yüzey proteini ve hyaluronidaz'ın *E. faecium* için spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Yatan hastalardan izole ettikleri 153'ü klinik, 118'i fekal toplam 271 adet *E. faecium* izolatında; *asaI*, *gelE* ve *cylA* genleri hiçbir izolatta belirlenmemiş, VREfm arasında *hyl* pozitifliği %16, *esp* geni pozitifliği ise %77 olarak saptanmıştır. Ayrıca vankomisin dirençli klinik suşlardaki *esp* oranının (%92) fekal suşlardan (%73) daha yüksek olduğu belirlenmiştir<sup>(7)</sup>. Rice ve ark.'nın<sup>(30)</sup> çalışmalarında da aynı sonuç ortaya çıkmıştır. Çalışmamız sonuçlarına göre, *esp* oranının fekal örneklerde daha düşük (%58), diğer klinik örneklerde daha yüksek (%83) olduğu belirlenmiştir. *hyl* oranı ise incelenen diğer virulans faktörlerine göre daha yüksek (%27) bulunmuştur. Bu sonuçlar *esp*'nin *E. faecium*'un patojenitesinde etkili olduğunu göstermektedir.

Vankomisine dirençli enterokoklar içinde *E. faecium*'un önemi son yıllarda arttığından, virulans faktörlerinin ve genotipik özelliklerinin

çok merkezli ve kapsamlı çalışmalarla araştırılması patojenitesinin aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Fernandes SC, Dhanashree B. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. Indian J Med Res. 2013;137(5):981-5.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009;155(6):1749-57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Comerlato CB, de Resende MCC, Caierao J, D'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(5):590-5. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108052013009>
- Gülhan T, Boynukara B, Çiftçi A, Söğüt MÜ, Fındık A. Determination of biofilm production, genotype and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus faecium* isolates originated from dog, cat and human. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2015;21(4):553-61. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.12956>
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3558-65. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3558-3565.2004>
- Kang M, Xie Y, He C, et al. Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu, China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(6):933-9. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2029-z>
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2004;42(10):4473-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004>
- 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. Braz J Infect Dis. 2016;20(2):127-33. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.11.011>
- Baylan O, Nazik H, Bektöre B, ve ark. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişki. Mikrobiyol Bul. 2011;45(3):430-45.
- 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*. Syst Appl Microbiol. 2011;34(8):553-60. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.05.002>
- Garsin DA, Willems RJL. Insights into the biofilm lifestyle of enterococci. Virulence. 2010;1(4):219-21. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.12073>
- Banerjee T. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of multidrug resistant *Enterococcus faecium* urinary isolates from a Tertiary Care Centre, Northern India. J Clin Diagn Res. 2013;7(12):2721-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6541.3742>
- Werner G, Willems RJL, Hildebrandt B, Klare I, Witte W. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2003;41(4):1499-506. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1499-1506.2003>
- Furlaneto-Maia L, Rocha KR, Siqueira VLD, Furlaneto MC. Comparison between automated system and PCR-based method for identification and antimicrobial susceptibility profile of clinical *Enterococcus* spp. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(2):97-103. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200002>
- Çiftçi A, Fındık A, İça T, Baş B, Onuk EE, Güngördü S. Slime production and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from arthritis in chickens. J Vet Med Sci. 2009;71(6):849-53. <https://doi.org/10.1292/jvms.71.849>
- Yean CY, Yin LS, Lalitha P, Ravichandran M. A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. BMC Microbiol. 2007;7:112. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-112>
- Huey B, Hall J. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*. Minisatellite probe from bacteriophage M13. J Bacteriol. 1989;171(5):2528-32. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2528-2532.1989>
- Aktaş Z, Diyarbakırlı P, Bal Ç, et al. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşlarının fenotipik ve genotipik olarak incelenmesi. Mikrobiyol Bul. 2007;41(3):347-56.
- Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 2008;128(2):111-21.
- Banerjee T, Anupurba S. Prevalence of virulence factors and drug resistance in clinical isolates of enterococci: A study from North India. J Pathog. 2015;2015:692612. <https://doi.org/10.1155/2015/692612>
- Willems RJL, Bonten MJM. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. Curr Opin Infect Dis. 2007;20(4):384-90. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e32818be63d>
- Sillanpää J, Nallapareddy SR, Singh KV, et al. Characterization of the *ebpM* pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. Virulence. 2010;1(4):236-46. <https://doi.org/10.4161/viru.1.4.11966>
- Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. J Bacteriol. 2007;189(22):8233-40. <https://doi.org/10.1128/JB.01205-07>
- Ballering KS, Kristich CJ, Grindle SM, Oromendia A, Beattie DT. Functional genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation in the core genome. J Bacteriol. 2009;191(8):2806-14. <https://doi.org/10.1128/JB.01688-08>
- Routsi C, Platsouka E, Willems RJL, et al. Detection of enterococcal surface protein gene (*esp*) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit. J Clin Microbiol. 2003;41(12):5742-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5742-5746.2003>
- Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 2000;38(11):4242-5.
- Van den Braak N, Power E, Anthony R, Endtz HP, Verbrugh HA, Van Belkum A. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of SmaI DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. FEMS Microbiol Lett. 2000;192(1):45-52. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09357.x>
- Thierfelder C, Keller PM, Kocher C, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* A multiple-strain outbreak of eight weeks duration at a Swiss tertiary care hospital. Swiss Med Wkly. 2012;142:135-40. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13540>
- Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanB*: clonal distribution, prevalence and significance of *esp* and *hyl* in Australian patients with haematological disorders. J Hosp Infect. 2008;68(2):137-44. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.10.017>
- Rice LB, Carias L, Rudin S, et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. J Infect Dis. 2003;187(3):508-12. <https://doi.org/10.1086/367711>