



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA
DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ BELİRLENMESİ**

İSMET KUTLUK

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2018



**VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA DİRENÇ GENLERİNİN
VARLIĞININ BELİRLENMESİ**

İsmet KUTLUK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2018

İsmet KUTLUK tarafından hazırlanan “VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Melahat KURTULUŞ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan: Prof. Dr. Ahmet BAŞUSTAOĞLU

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi

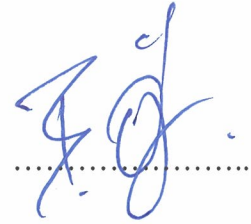
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Prof. Dr. Berrin ÖZÇELİK

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 23/01/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



İsmet KUTLUK

23.01.2018

VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA DİRENÇ GENLERİNİN VARLIĞININ BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

İsmet KUTLUK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2018

ÖZET

Normal bağırsak flora elemanı olan enterokoklar son yıllarda endokardit, sepsis, menenjit ve idrar yolları enfeksiyonları gibi ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmalar arasında yer almıştır. Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptit antibiyotiklerine karşı geliştirdikleri direnç enterokokların önemli bir hastane enfeksiyonu etkeni olmalarına neden olmuştur. Son yıllarda glikopeptit direncinde gözlenen artış vankomisin dirençli enterokokların yol açtığı ciddi enfeksiyonlarının tedavi seçeneklerini de kısıtlamıştır. Vankomisin dirençli enterokok vakalarında direncin genetik temelini araştırılması, hastane enfeksiyonlarının etkin tedavisi ve direncin minimuma indirilmesinde alınacak önlemlerin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu çalışmada 2011-2017 yılları arasında Gazi Üniversitesi Hastanesi'nden toplanan vankomisin dirençli enterokokların direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. Toplam 7551 enterokok suşunun 179'unda vankomisin direncine rastlanmış olup, 107 izolat direnç genleri yönünden incelenmiştir. İncelenen 107 örneğin 96'sının (%89,72) VanA, 1 örneğin (%0,93) VanB tipi direnç gösterdiği saptanmıştır.

Bilim Kodu : 1039.5

Anahtar Kelimeler : Enterokok, antibiyotik direnci, moleküler mikrobiyoloji

Sayfa Adedi : 52

Danışman : Doç. Dr. Melahat KURTULUŞ

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN
VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI

(M. Sc. Thesis)

Ismet KUTLUK

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2018

ABSTRACT

Enterococci are known to cause serious nosocomial infections such as endocarditis, sepsis, meningitis and urinary tract infections. Glycopeptide antibiotics such as vancomycin and teicoplanin are commonly used for the treatment of severe infections caused by Gram (+) bacteria, such as Enterococci. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have shown an increase in prevalence in recent years. Determination of the resistance genotypes is particularly important for the rapid and effective treatment of some severe infections and prevention of hospital-acquired infections. Aim of this study is to determine the glycopeptide resistance genotypes of VRE that were isolated in Gazi University Hospital during 2011-2017 using polymerase chain reaction. 179 of the 7551 enterococcal isolates were found to be resistant to vancomycin. 107 VRE isolates were selected for genotype analysis. 96 (89.72%) isolates were found to have VanA type resistance, while only one (0.93%) was found to exhibit VanB type resistance.

Science Code : 1039.5

Key Words : Enterococcus, antibiotic resistance, molecular microbiology

Page Number : 52

Advisor : Assoc. Prof. Melahat KURTULUS

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enterokokların Genel Özellikleri	3
2.2. Enterokokların Tarihçesi	3
2.3. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler	5
2.4. Hücre Duvarı	6
2.4.1. Peptidoglikan.....	7
2.4.2. Teikoik asitler.....	10
2.4.3. Lipoteikoik asitler	11
2.5. Virülans ve Patojenite	12
2.5.1. Enterokokal yüzey proteini (Esp).....	13
2.5.2. Agregasyon faktörü (AS)	13
2.5.3. Sitolizin (Hemolizin).....	13
2.5.4. Jelatinaz ve serin proteaz	14
2.5. Antibiyotik Direnci ve Mekanizmaları	14
2.6.1. Beta laktam direnci	16

	Sayfa
2.6.2. Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci.....	17
2.6.3. Oksazolidinon direnci	17
2.6.4. Aminoglikozit direnci	18
2.6.5. Daptomisin direnci	18
2.6.6. Kinolon direnci.....	19
2.6.7. Glikopeptit direnci	19
2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	22
2.8. Enterokokların Yol Açtığı Enfeksiyonlar	22
2.8.1. Üriner sistem enfeksiyonları	23
2.8.2. Endokardit.....	23
2.8.3. Bakteriyemi	24
2.8.4. Yumuşak doku, abdomen ve pelvis enfeksiyonları.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Besiyeri ve Çözeltiler	25
3.1.1. Müller Hinton sıvı besiyeri	25
3.1.2. Müller Hinton katı besiyeri	25
3.1.3. Koyun kanlı agar	25
3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu solüsyonları	25
3.1.5. Tris- Borik asit- EDTA (TBE) tamponu	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Vankomisin dirençli enterokokların belirlenmesi	26
3.2.2. İzolatların saklanması	27
3.2.3. Örnek seçim kriterleri	27
3.2.4. İzolatların pasajlanması	27

	Sayfa
3.2.5. Bakteriyel DNA Eldesi	27
3.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
3.2.7. Amplifiye Ürünlerin Değerlendirilmesi	29
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1.	3
Çizelge 2.2.	20
Çizelge 3.1.	28
Çizelge 3.2.	28
Çizelge 4.1.	31
Çizelge 4.2.	32
Çizelge 4.3.	33
Çizelge 4.4.	34

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1.	6
Şekil 2.2.	7
Şekil 2.3.	8
Şekil 2.4.	10
Şekil 2.5.	11
Şekil 2.6.	12
Şekil 2.7.	14
Şekil 4.1.	31
Şekil 4.2.	33
Şekil 4.3.	35

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1.	5
Resim 3.1.	29
Resim 3.2.	29



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

bç	Baz çifti
kDa	Kilodalton
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

NAG (GlcNAc)	N-asetil glukozamin
NAM (MurNAc)	N-asetil muramik asit
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
PBP	Penisilin bağlayan protein
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PYRaz	Pirolidonil aminopeptidaz
UHESA	Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı
VRE	Vankomisin dirençli enterokok

1. GİRİŞ

1940’larda penisilinin kullanıma girmesiyle birlikte antibiyotik öncesi dönem sona ermiş ve enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölümlerde ciddi bir düşüş gözlenmiştir. Ancak günümüze kadar gerek bilinçsiz antibiyotik tüketiminin, gerekse mikroorganizmaların birbirleri arasında direnç genlerini transfer edebilme özelliklerinden dolayı antibiyotik direnci gittikçe yaygınlaşmış ve insan sağlığını ciddi anlamda tehdit eder hale gelmiştir.

Yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi oldukça uzun ve masraflı bir süreç iken, piyasaya sürülen bileşiklere hızla direnç gelişmesi bu ürünlerin ekonomik getirilerini iyice düşürmektedir. Bu yüzden ilaç firmalarının antibiyotiklere ayırdığı Ar-Ge bütçeleri de giderek azalmakta ve problem daha da büyümektedir [1–3].

İnsanların ve birçok canlının normal florasının yanı sıra, başlıca toprak ve sularda olmak üzere doğada bolca bulunan enterokoklar yakın zamana kadar ciddi patojenler olarak görülmezken; kazandıkları ve aktardıkları direnç ve virülans genlerinden dolayı yol açtıkları endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi enfeksiyonlarla günümüzde Amerika Birleşik Devletleri’ndeki en yaygın ikinci nozokomiyal enfeksiyon etkeni haline gelmiştir. Özellikle glikopeptit dirençli enterokokların yol açtığı enfeksiyonlarda, uygulanabilecek antimikrobiyal tedavi opsiyonları nispeten yeni ve pahalı bileşiklerle sınırlı kalmaktadır [4–7].

Tedavi seçenekleri kısıtlı enfeksiyon hastalıklarında, hastalık etkeni mikroorganizma türünün ve direnç genlerinin moleküler tekniklerle hızlı bir şekilde tanımlanması; hem hastaya etkin bir tedavinin sağlanabilmesi, hem de gelecekte antimikrobiyal tedavi stratejilerinin belirlenmesi açısından kritik önem taşımaktadır [8, 9].

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda 2011-2017 yılları arasında glikopeptit dirençli olduğu belirlenen enterokokların duyarlı enterokoklar ve diğer bakteri cinsleri arasında görülme sıklığı, yol açtıkları enfeksiyon türleri ve poliklinik ve servislere göre dağılımları tespit edilmiştir. İzolatların antibiyotik direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle belirlenmiştir. Vankomisin dirençli enterokoklardaki direnç genotip oranlarının yıllara göre dağılımı ile

ilgili bilgilerin enfeksiyon kontrol komitelerinin direnç önleme politikalarında yol gösterici olması beklenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterokokların Genel Özellikleri

“Enterokok” terimi *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Lactobacillales* takımı, *Enterococcaceae* familyasında yer alan *Enterococcus* genusunu tanımlamaktadır. Laktik asit bakterilerinin önemli bir cinsidir. İnsanların yanı sıra böcekler dâhil birçok hayvan türünün sindirim sistemlerinde, bitkilerde, toprakta ve sularda bol miktarda bulunurlar. Proteolitik ve lipolitik özelliklerinden dolayı gıda ürünlerinde bozulma ve kokuşmaya yol açarlar. İlaç ve gıda endüstrilerinde probiyotik olarak ve bazı et ürünleri ve peynir çeşitlerinin fermentasyonunda kullanılırlar.

2.2. Enterokokların Tarihçesi

“Enterokok” terimi ilk olarak 1899’da Thiercelin tarafından intestinal florada keşfedilen diplokokları tanımlamak için kullanılmıştır [10]. 1906 yılında Andrewes ve Horder tarafından endokarditli bir hastanın kanından izole edilen mikroorganizma *Streptococcus faecalis* olarak adlandırılmıştır [11]. 1933’e kadar streptokokların birbirinden ayrımı için yalnızca fermentasyon ve tolerans testleri kullanılırken, 1933’te Lancefield tarafından beta hemolitik suşların antijenik yapılarına göre gruplandırılmasını sağlayan serolojik tiplene yöntemi geliştirilmiştir [12]. 1937 yılında Sherman streptokokları piyojenik, viridans, laktik ve enterokoklar olarak dört gruba ayırmıştır [13, 14]. D grubu streptokoklar olarak da anılan enterokokların genus ismi ise 1984 yılında *Streptococcus* yerine *Enterococcus* olarak değiştirilmiştir [15]. Günümüze kadar bu genusta 56 tür, 2 alt tür tanımlanmıştır:

Çizelge 2.1. Enterokok türleri [16]

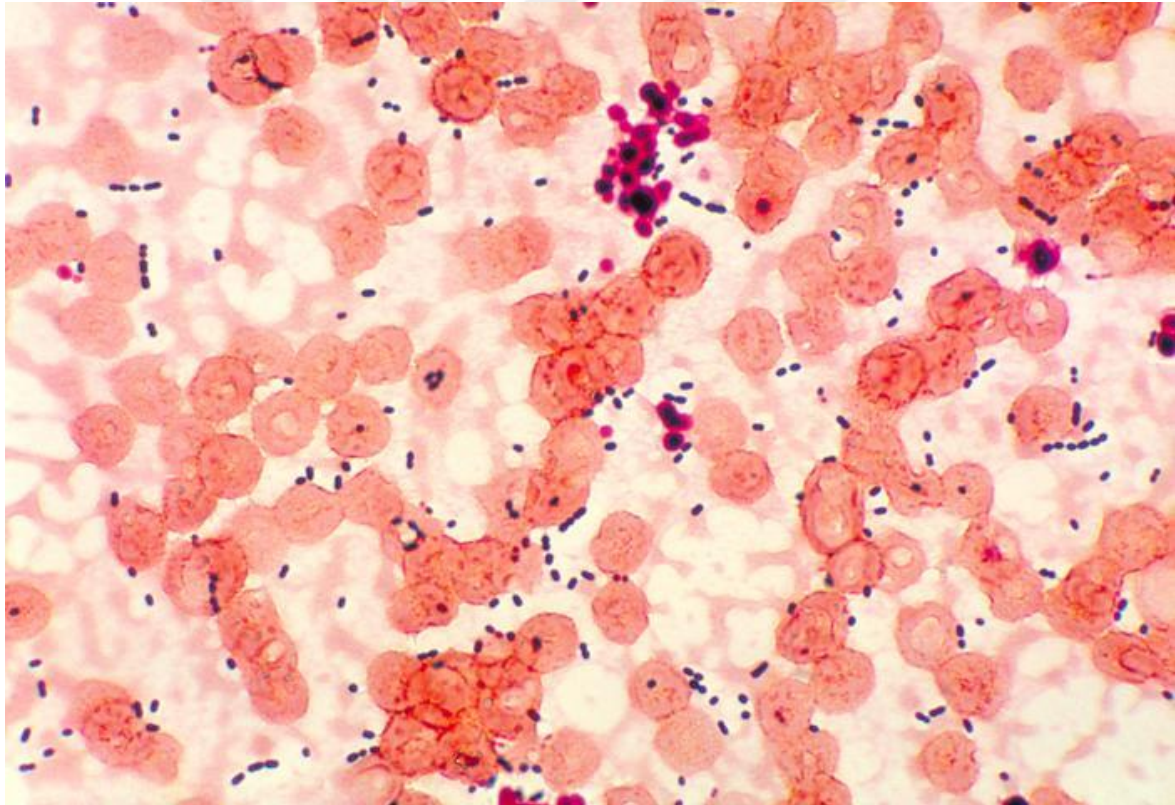
No	Tür	Yıl	Referans
1	<i>Enterococcus alcedinis</i>	2013	Frolkova ve ark [17]
2	<i>Enterococcus aquimarinus</i>	2005	Švec ve ark [18]
3	<i>Enterococcus asini</i>	1998	De Vaux ve ark [19]
4	<i>Enterococcus avium</i>	1984	Collins ve ark [20]
5	<i>Enterococcus bulliens</i>	2015	Kadri ve ark [21]
6	<i>Enterococcus caccae</i>	2006	Carvalho ve ark [22]
7	<i>Enterococcus camelliae</i>	2007	Sukontasing ve ark [23]
8	<i>Enterococcus canintestini</i>	2005	Naser ve ark [24]
9	<i>Enterococcus canis</i>	2003	De Graef ve ark [25]

No	Tür	Yıl	Referans
10	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1984	Collins ve ark [20]
11	<i>Enterococcus cecorum</i>	1983	Devriese ve ark [26]
12	<i>Enterococcus columbae</i>	1990	Devriese ve ark [27]
13	<i>Enterococcus devriesei</i>	2005	Švec ve ark [28]
14	<i>Enterococcus diestrammenae</i>	2013	Kim ve ark [29]
15	<i>Enterococcus dispar</i>	1991	Collins ve ark [30]
16	<i>Enterococcus durans</i>	1984	Collins ve ark [20]
17	<i>Enterococcus eurekensis</i>	2013	Cotta ve ark [31]
18	<i>Enterococcus faecalis</i>	1984	Schleifer ve Kilpper-Balz [15]
19	<i>Enterococcus faecium</i>	1984	Schleifer ve Kilpper-Balz [15]
20	<i>Enterococcus flavescens</i>	1992	Pompei ve ark [32]
21	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1984	Collins ve ark [20]
22	<i>Enterococcus gilvus</i>	2002	Tyrrell ve ark [33]
23	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	2001	Švec ve ark [34]
24	<i>Enterococcus hermanniensis</i>	2004	Koort ve ark [35]
25	<i>Enterococcus hirae</i>	1985	Farrow ve Collins [36]
26	<i>Enterococcus italicus</i>	2004	Fortina ve ark [37]
27	<i>Enterococcus lactis</i>	2012	Morandi ve ark [38]
28	<i>Enterococcus lemanii</i>	2013	Cotta ve ark [31]
29	<i>Enterococcus malodoratus</i>	1984	Collins ve ark [20]
30	<i>Enterococcus moraviensis</i>	2001	Švec ve ark [34]
31	<i>Enterococcus mundtii</i>	1986	Collins ve ark [39]
32	<i>Enterococcus olivae</i>	2014	Lucena-Padrós ve ark [40]
33	<i>Enterococcus pallens</i>	2002	Tyrrell ve ark [33]
34	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	2003	Law-Brown ve Meyers [41]
35	<i>Enterococcus plantarum</i>	2012	Švec ve ark [42]
36	<i>Enterococcus porcinus</i>	2001	Teixeira ve ark [43]
37	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	1989	Collins ve ark [44]
38	<i>Enterococcus quebecensis</i>	2012	Sistek ve ark [45]
39	<i>Enterococcus raffinosus</i>	1989	Collins ve ark [44]
40	<i>Enterococcus ratti</i>	2001	Teixeira ve ark [43]
41	<i>Enterococcus rivorum</i>	2012	Niemi ve ark [46]
42	<i>Enterococcus rotai</i>	2013	Sedláček ve ark [47]
43	<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	1991	Rodrigues ve Collins [48]
44	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> subsp. <i>saccharolyticus</i>	2013	Chen ve ark [49]
45	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> subsp. <i>taiwanensis</i>	2013	Chen ve ark [49]
46	<i>Enterococcus saccharominimus</i>	2004	Vancanneyt ve ark [50]
47	<i>Enterococcus saigonensis</i>	2016	Harada ve ark [51]
48	<i>Enterococcus seriolicida</i>	1991	Kusuda ve ark [52]
49	<i>Enterococcus silesiacus</i>	2006	Švec ve ark [53]
50	<i>Enterococcus solitarius</i>	1989	Collins ve ark [44]
51	<i>Enterococcus sulfureus</i>	1991	Martinez-Murcia ve Collins [30]
52	<i>Enterococcus termitis</i>	2006	Švec ve ark [53]
53	<i>Enterococcus thailandicus</i>	2008	Tanasupawat ve ark [54]

No	Tür	Yıl	Referans
54	<i>Enterococcus ureasiticus</i>	2012	Sistek ve ark [45]
55	<i>Enterococcus ureilyticus</i>	2013	Sedláček ve ark [47]
56	<i>Enterococcus viikkiensis</i>	2011	Rahkila ve ark [55]
57	<i>Enterococcus villorum</i>	2001	Vancanneyt ve ark [56]
58	<i>Enterococcus xiangfangensis</i>	2014	Li ve ark [57]

2.3. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler

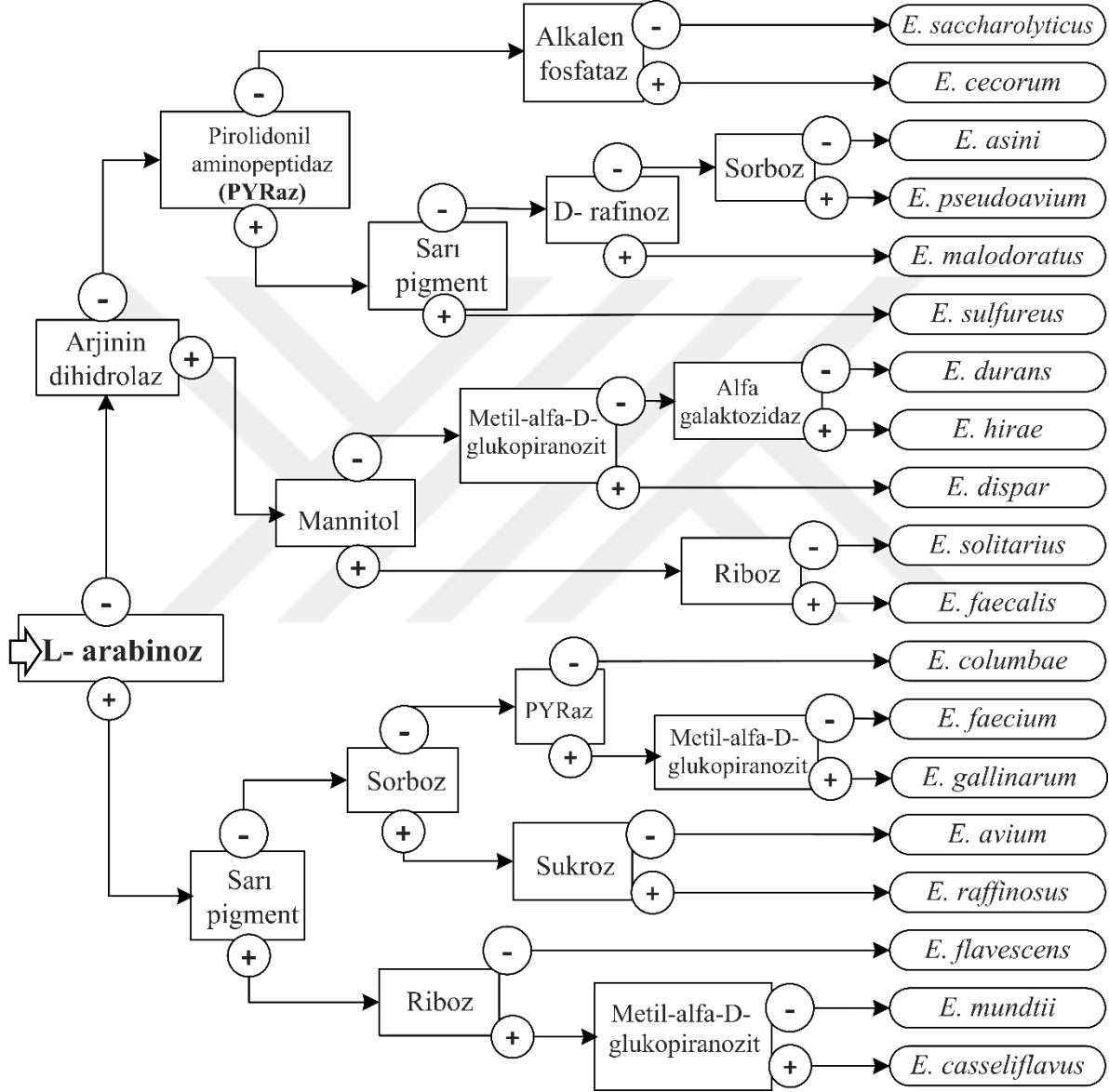
Enterokoklar tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde gözlenen Gram pozitif fakültatif aerob koklardır. Mikroskopik olarak streptokoklardan ayrılamazlar. Kanlı agarda 0,5 – 1,5 mm boylarında gri, parlak ve buğulu görünümlü koloniler oluşturur, sıvı besiyerinde bulanıklık oluşturmadan dipte çökelti oluşturarak ürerler.



Resim 2.1. Enterokokların mikroskopik görünümü [58]

Katalaz negatif olmalarına rağmen bazı suşlarda psödokatalaz aktivite görülebilir. Optimum üreme sıcaklıkları 35 °C olmakla birlikte 10 – 45 °C arasında üreyebilmektedirler. Enterokokların tamamı %6,5 NaCl içeren ortamda üreyebilmekte ve %40 safra tuzu varlığında eskülini hidroliz edebilmektedir [59]. Bazı *Enterococcus faecalis* suşları insan

veya at kanı içeren agarda beta hemoliz yapabilir, ancak koyun kanlı agarda nonhemolitik. Bazı *E. durans* suşları bütün kanlı agar ortamlarda beta hemoliz yapar. Diğer enterokok türlerinde ise alfa veya gama hemoliz görülür. Bütün enterokoklar lösinaminopeptidaz oluşturur. Glukozdan gaz oluşturmazlar, glukoz fermantasyonunun son ürünü ise laktik asittir.



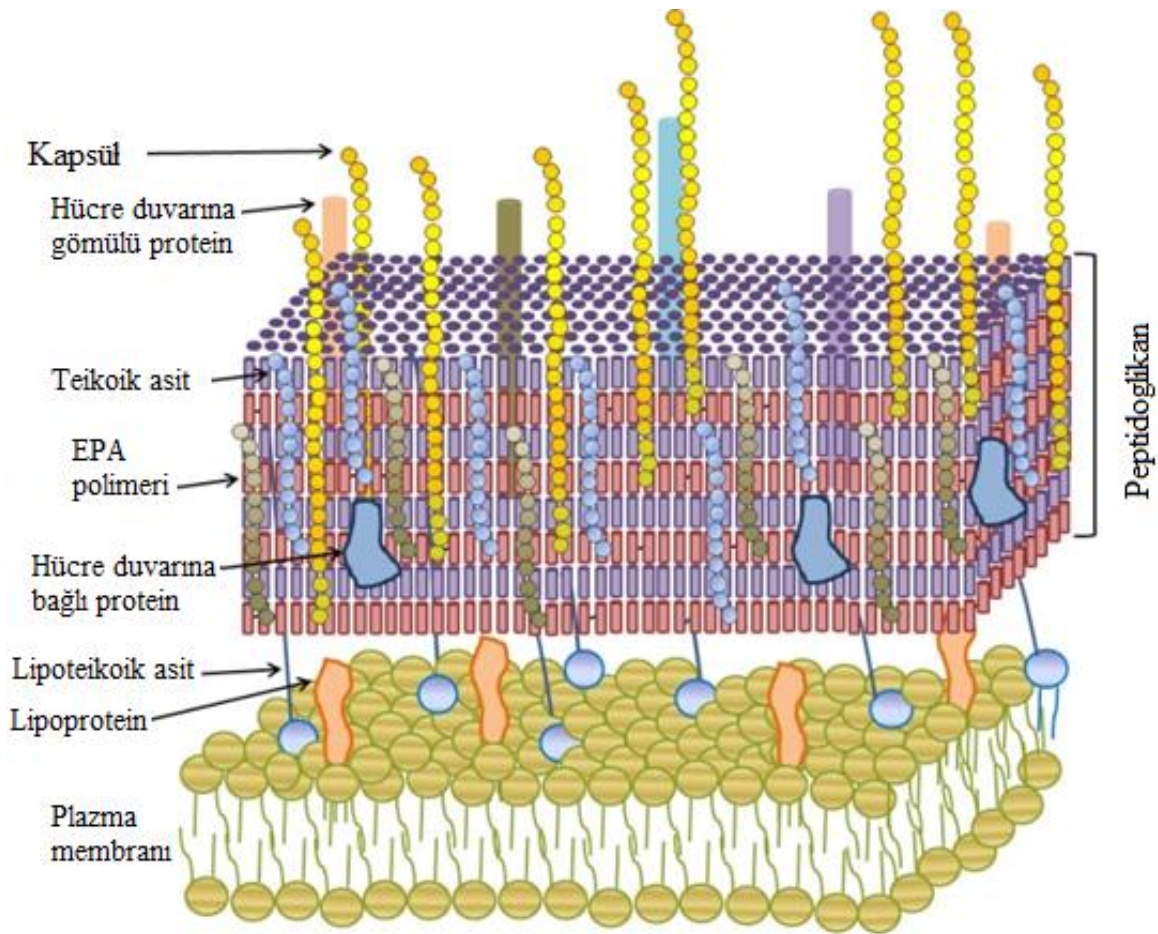
Şekil 2.1. Enterokok türlerinin biyokimyasal testlerle tanımlanması [60]

2.4. Hücre Duvarı

Enterokokların hücre duvar yapısı diğer Gram pozitif koklara benzemektedir. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikan iskelet, anyonik polimerler (teikoik asit ve polisakkaritler) ve hücre duvar proteinleri olmak üzere başlıca üç ana yapıdan oluşur.

Peptidoglikan ve polimerler hücre ağırlığının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Hücre duvar proteinleri ise total hücre ağırlığının %10'a yakın bir kısmını teşkil eder [61].

Enterokokların Lancefield sınıflandırmasında D grubunda yer almalarının sebebi, hücre duvarında bulunan poligliserolfosfatın teikoik asit polimeri yapısındaki D antijenidir. Sitoplazmik membrandan veya hücre duvarından köken alan protein ve glikolipitlerin mikroorganizmaya antijenik ve patojenik özellikler kazandırdığı bilinmektedir.



Şekil 2.2. Gram pozitif hücre duvar yapısı [62]

2.4.1. Peptidoglikan

Enterokok hücre duvarının majör bileşeni olan peptidoglikan tabaka, N-asetil muramik asit (NAM veya MurNAc) ve N-asetil glukozamin (NAG veya GlcNAc) ünitelerinin $\beta(1-4)$ bağı yaparak oluşturduğu disakkaritin art arda tekrarlanmasıyla oluşur. Tekrarlayan bu şekerlerin bir araya gelmesiyle genellikle 5-30 alt birimden oluşan iplikler, birleşirken NAM'a bağlı

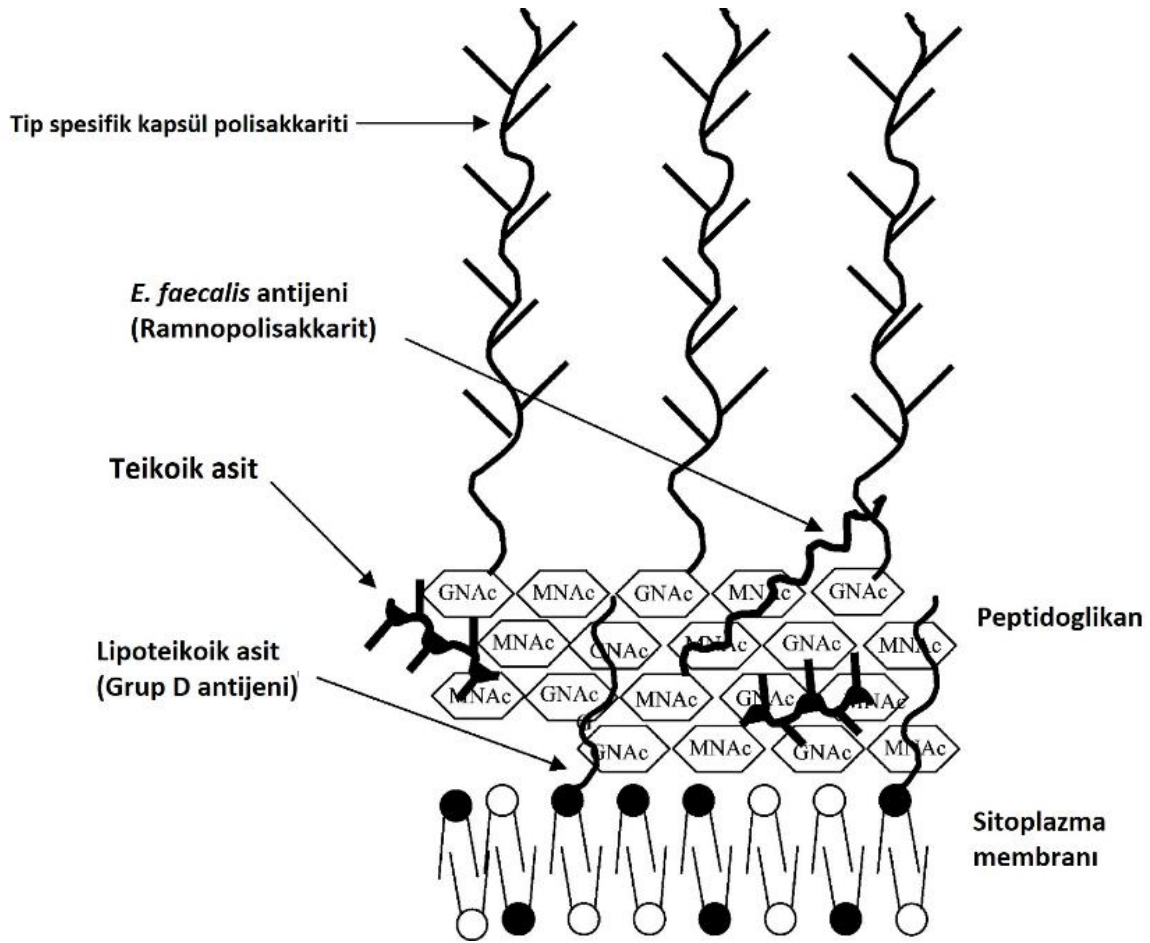
sentezini takiben peptit grubunun ilk üç aminoasidi sırayla MurC, MurD ve MurE sentetazlar tarafından eklenerek UDP-NAM-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys molekülü oluşturulur. D-Ala rasemaz ile iki L-Ala ünitesi D-Ala'ya dönüştürüldükten sonra D-Ala ligaz ile D-Ala-D-Ala dipeptidi oluşturulur. Ardından bu dipeptit MurF transferaz tarafından gövdeye eklenerek UDP-NAM-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala molekülü oluşturulur. Bu moleküle Park nükleotidi de denir [62].

Çözünür durumdaki Park nükleotidinin hücre membranında taşınması için undekaprenol (C55) yapıdaki bir lipit taşıyıcıya ihtiyaç vardır. Fosfat bağlı bu taşıyıcıya (undekaprenil monofosfat), Park molekülü UDP kısmından bağlanır ve üridin monofosfat grubu yapıdan ayrılır. MraY'nin kataliziyle gerçekleşen bu yer değiştirme sonucunda C55-PP-NAM-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala yapısındaki **Lipid I** molekülü oluşur. Daha sonra MurG'nin kataliziyle Lipid I'e UDP-NAG bağlanmasıyla C55-PP-NAM(-L-Ala-D-isoGlu-L-Lys-D-Ala-D-Ala)-(β1-4)-NAG yapısındaki **Lipid II** molekülü sentezlenir. Ardından bu molekül, undekaprenol grubu membran içinde kalacak şekilde hücre membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine çevrilir.

Peptidoglikan biyosentezinin son aşaması hücre membranının dış yüzeyinde gerçekleşir. PBPlar veya monofonksiyonel glikozil transferazlar tarafından katalizlenen transglikozilasyon reaksiyonu ile peptidoglikan öncülü lipit taşıyıcıdan ayrılır. Bu lipit taşıyıcı bir fosfat grubunu kaybederek undekaprenil monofosfata dönüşür ve membranın iç yüzüne dönüp yeni bir molekül taşımaya hazır hale gelir. Glikan grubundan peptidoglikan yapıya eklenen alt birimlerin peptit zincirleri birbirine arasında transpeptidasyon reaksiyonları ile çapraz bağlanır. Birbirine komşu iki peptit zincirinden donör zincirin dördüncü aminoasidi olan D-alanin, akseptör zincirin üçüncü aminoasidi olan L-lizin ile peptit bağı oluşturur. Donör pentapeptit zincirinin beşinci aminoasidi olan D-alanin ise karboksipeptidazlar tarafından çıkarılarak aynı yan zincirin başka bir transpeptidasyon reaksiyonunun substratı olması önlenir. Transpeptidasyon reaksiyonları D-Ala-D-Ala ile sonlanan peptitlerin uygunluğu ile de kontrol edilmektedir. Bütün peptit zincirlerinin komşu bir zincirle çapraz bağ yapmadığı, böylece yapıda oluşan düzensizlikler sayesinde farklı açıklıklarda porların oluşmasının sağlandığı bilinmektedir [65]

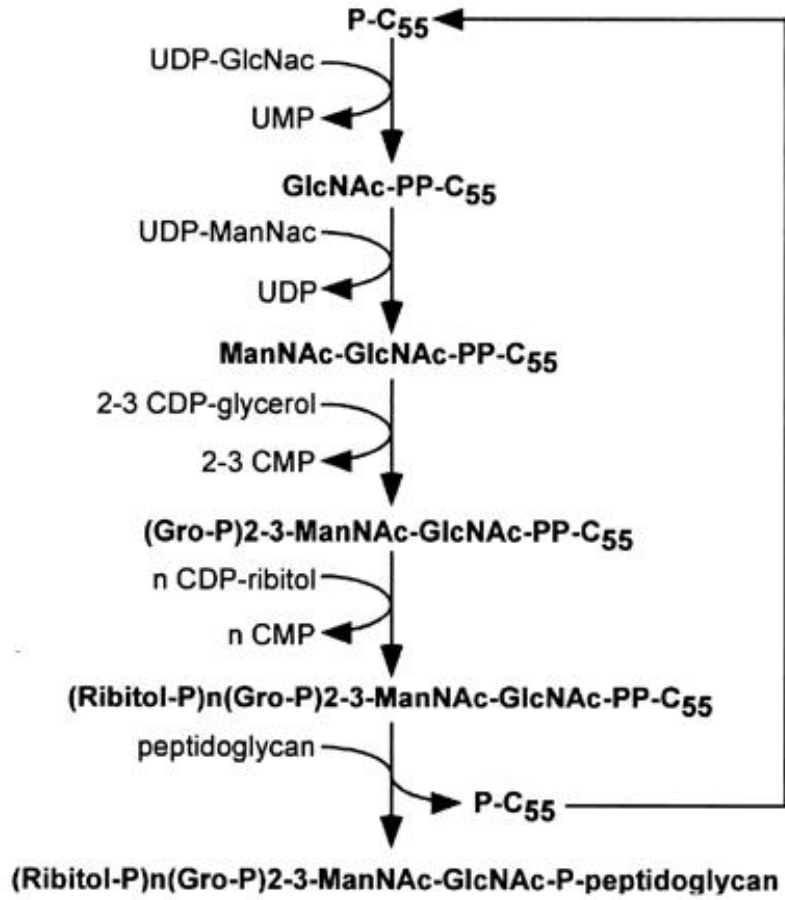
2.4.2. Teikoik asitler

Bütün Gram pozitif bakterilerin peptidoglikana kovalent bağlı ya da bir lipit birimine tutunmuş durumda anyonik polimerler sentezlediği düşünülmektedir. Bu polimerler hepsi glukozillenebilen ya da aminoasitlerle esterleşebilen poligliserol fosfat (Gro-P), poliribitol fosfat (Rit-P) veya poliglukozil fosfat (Glc-P) yapılarıdır.



Şekil 2.4. Teikoik asit yapısı [62]

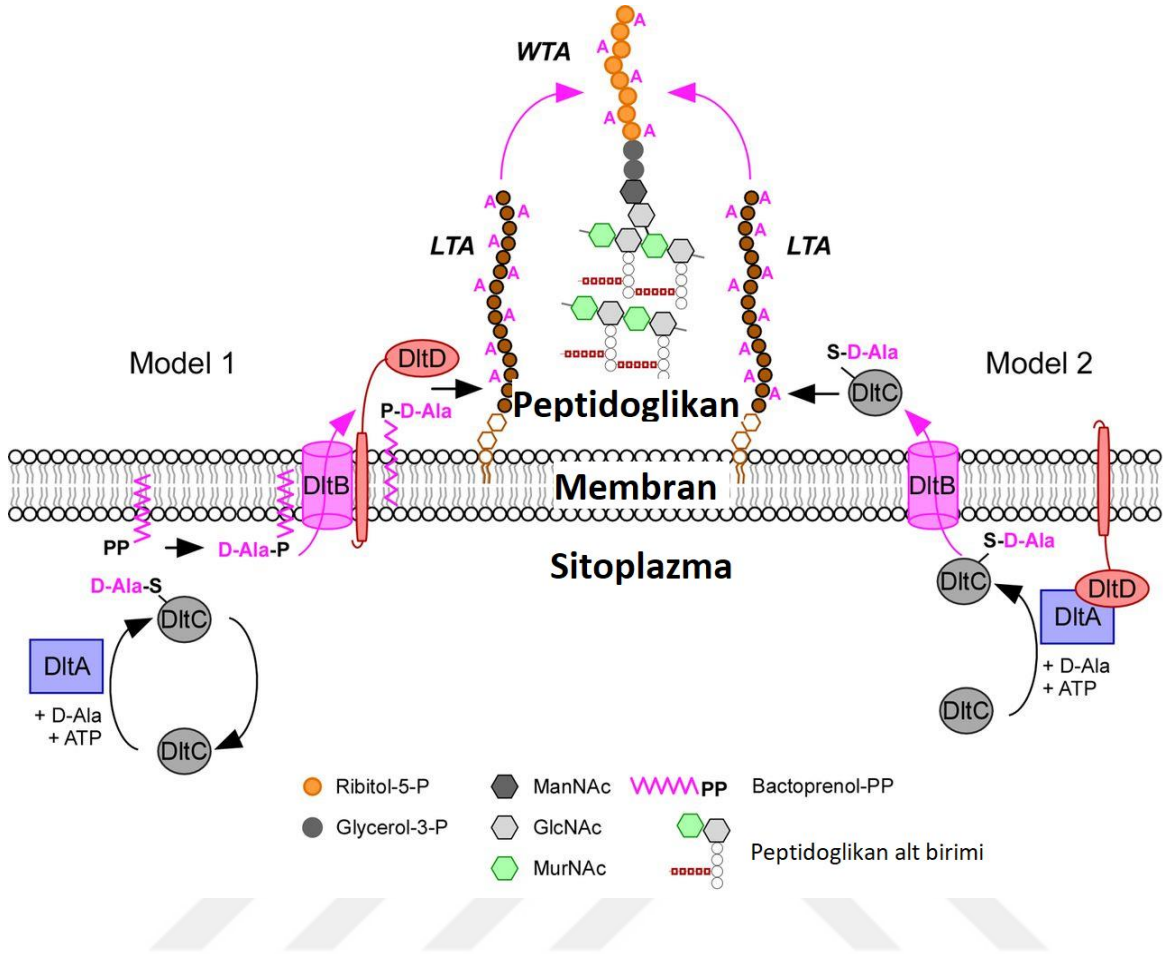
Gro-P ya da Rit-P'nin D-Ala ile esterifikasyonu sitoplazmik membranın yüzeyinde, teikoik asitler membran boyunca taşındıktan sonra gerçekleşir. Bu süreçte D-Ala önce bir diaçil taşıyıcı proteine bağlanır, ardından undekaprenol fosfat yapıda bir lipit taşıyıcıya aktarılır. Lipit bağlı D-Ala sitoplazmik membrandan geçirilir ve esterifikasyon için substrat haline gelir. Hücre duvarı teikoik asitlerinin peptidoglikan iskeleti üzerinde tekdüze bir şekilde dağıldığı düşünülmektedir.



Şekil 2.5. Teikoik asit sentezi [62]

2.4.3. Lipoteikoik asitler

Lipoteikoik asitler, lipit kısımları ile sitoplazmik membranın dış kısmına gömülü halde bulunan polianyonik polimerlerdir. Peptidoglikanın içinden hücrenin yüzeyine uzanırlar. Fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. *Streptococcus pneumoniae* hariç bütün Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı teikoik asitleri ve lipoteikoik asitlerin kimyasal bileşimleri birbirinden farklıdır. Lipoteikoik asitlerin sentezinin, sitoplazmik membranın yüzeyinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu yüzden, bileşenlerinin bir araya getirilmeden önce membrandan taşınması gerekmektedir. Bu amaçla bütün öncüller glikolipit, fosfatidilgliserol, heksozil-1-fosfoundekaprenol veya undekaprenil-D-Ala gibi lipofilik bir birime bağlanır.



Şekil 2.6. Lipoteikoik asit biyosentezi [66]

Lipoteikoik asit biyosentezi sitoplazmada gliserol, ATP ve iki açıl yan zincirden fosfatidik asit senteziyle başlar. Daha sonra fosfatidik asit fosfatidil gliserofosfata, bu da Gro-P'nin polimerizasyonunda substrat görevi gören fosfatidil gliserole dönüştürülür. Lipoteikoik asit glikozilasyonu için undekaprenile bağlı heksoz şekeri kullanılmaktadır.

2.5. Virülans ve Patojenite

Mikroorganizmaların virülans özellikleri, genom üzerinde "patojenite adası" adı verilen bölgelerde regüle edilmektedir. Enterokokların patojenite adası ise ilk kez 1980'lerde salgına yol açan bir *Enterococcus faecalis* MMH594 çoklu dirençli suşunun genomunda keşfedilmiştir [65].

Enterokoklar bağırsak florasında kommensal olarak yer aldığı halde, bazı var olan koşullar ve genetik materyal edinme kabiliyetleri başka yerleri kolonize etmelerine ve enfeksiyonlar oluşturmalarına yol açabilir. Bu mikroorganizmaların virülansından tek bir faktör sorumlu

değildir. Enterokoklarda virülanstan sorumlu en önemli faktörlere enterokokal yüzey proteini (Esp), agregasyon bileşeni (AS), hemolizin, jelatinaz ve serin proteaz örnek verilebilir [67].

2.5.1. Enterokokal yüzey proteini (Esp)

Enterokokal yüzey proteini (Esp) ilk kez bakteriyemi vakasından izole edilmiş gentamisin dirençli, virülansı oldukça yüksek bir *Enterococcus faecalis* suşunda tanımlanmış olup, klinik izolatlarda miktarının daha fazla bulunduğu saptanmıştır [68]. Yaklaşık 200 kDa büyüklüğündeki bu protein, *Staphylococcus aureus*'ta bulunan Bap (Biyofilm ilişkili protein) ile yapısal olarak benzerlik göstermektedir [69]. 153 kb büyüklüğünde bir patojenite adasında yer alan *esp* geni tarafından kodlanan bu faktör hücreye çeşitli yüzeylere tutunabilme ve biyofilm oluşturma gibi özellikler kazandırmaktadır, ancak hücre adhezyonu veya bağırsak kolonizasyonu için gerekli değildir [70–72].

2.5.2. Agregasyon faktörü (AS)

Agregasyon faktörü (AS) proteinleri, konjugatif feromon cevap plazmitleri tarafından kodlanan bir grup yapıca benzer çok fonksiyonlu hücre duvarına gömülü proteindir. Bu proteinlerden *Asa1*, *asal* geni tarafından pAD1 plazmitinde; *Asc10* *prgB* tarafından pCF10'da, *Asp1* ise *aspl* tarafından yine pPD1'de kodlanmaktadır [73–75]. N terminalleri civarında yer alan ve agregasyon veya lipoteik asit bağlanması gibi olayları kontrol eden değişken bölge dışında bu proteinler aminoasit düzeyinde %90 kadar benzerlik göstermektedir [76]. Donör hücre yüzeyinde AS ekspresyonu, plazmit taşımayan alıcı hücrelere konjugasyon ile plazmit aktarımı için güçlü tutunmasını sağlamaktadır [77]. Konak dokularına ya da cansız yüzeylere tutunmayı arttırdığı ve endokardit, üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlarda etkili olduğu bilinmektedir [78].

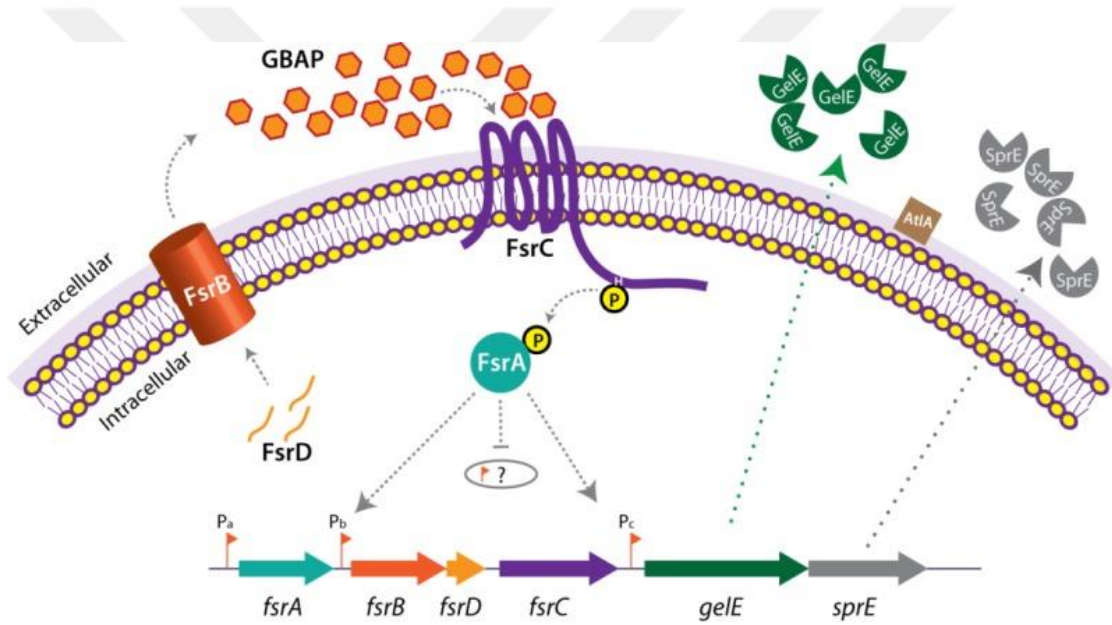
2.5.3. Sitolizin (Hemolizin)

Sitolizin, enterokok bakteriyosinleri içinde en çok araştırılmış olanlardan biridir [79]. Birçok Gram pozitif bakteriye karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasının yanında retina, insan bağırsak epiteli, polimorfonükleer lökosit ve eritrosit gibi ökaryotik hücrelere karşı da litik

aktivite gösterir. Eritrositleri parçalayarak hemoliz oluşturmasından dolayı sıklıkla **hemolizin** olarak da adlandırılır [80].

2.5.4. Jelatinaz ve serin proteaz

Jelatinaz ve serin proteaz, enterokokların salgıladığı proteazlardan üzerinde en çok araştırma yapılmış ikisidir. *gelE* tarafından kodlanan bir matriks metaloproteaz olan jelatinaz (metaloendopeptidaz) jelatin, kollajen, kazein ve hemoglobin dâhil başka peptitleri de hidrolize edebilmektedir. *sprE* tarafından kodlanan serin proteaz ile birlikte *fsr* adı verilen *E. faecalis* regülatör lokusu üzerinden kontrol edilirler [81, 82].



Şekil 2.7. *fsr* regülatör bölgesi [83]

2.6. Antibiyotik Direnci ve Mekanizmaları

Antibiyotik direnci bakterilerin bir antibiyotik etkisine direnme kabiliyetidir. Antibiyotik direnci, bakterilerin, enfeksiyonları iyileştirmek veya önlemek için tasarlanmış ilaçlar, kimyasallar veya diğer ajanların etkinliğini azaltacak şekilde değiştiğinde ortaya çıkmaktadır. Terapötik düzeyde bir antibiyotik varlığında bile bakteri hayatta kalır ve çoğalmaya devam ederek canlıya daha fazla zarar verir.

Antibiyotik direnç mekanizmaları:

Bazı bakteriler doğal olarak belirli antibiyotik tiplerine dirençlidir (doğal direnç). Bununla birlikte, bakteriler iki şekilde dirençli hale gelebilir (kazanılmış direnç): 1) bir genetik mutasyon ya da 2) başka bir bakteriden direnç genleri kazanarak. Enterokoklarda yeni DNA parçalarının transferini sağlayan mekanizma **konjugasyondur**.

Mutasyon bakterilerin genetik materyalinde kendiliğinden olan nadir değişimlerdir. Yaklaşık olarak 10 milyon yada 1 milyon hücreden 1 hücrede mutasyonun gerçekleştiği düşünülmektedir. Farklı genetik mutasyonlar farklı direnç tiplerinin oluşmasını sağlamaktadır. Bazı mutasyonlar bakterilerin, antibiyotikleri inaktive eden enzimler üretmesini sağlarken, diğer mutasyonlar, antibiyotiklerin bakterideki hedefini ortadan kaldırmaktadır. Bazıları, hücrenin içine antibiyotik girişini önler ve diğerleri, antibiyotiği hücrenin dışına doğru atarak, hedeflerine ulaşamayacakları pompalama mekanizmaları üretirler.

Bakteriler çeşitli yollarla diğer bakterilerden antibiyotik direnç genleri kazanabilirler. "Konjugasyon" adı verilen basit bir çiftleşme sürecine giren bakteriler, bir bakteriden diğerine plazmit ve transpozonlarda bulunan antibiyotik direnci kodlayan genler de dâhil olmak üzere genetik materyali aktarabilirler. Virüsler, bakteriler arasında direnç özelliklerini aktarmada kullandıkları başka bir mekanizmadır. Bir bakteriden gelen direnç özellikleri, virüsün baş kısmına paketlenir. Virüs daha sonra direnç özelliklerini enfekte ettiği yeni bakterilere enjekte eder. Bakteriler ayrıca çevrelerinden "çıplak" DNA edinme yeteneğine de sahiptirler.

Kendiliğinden mutasyonla ya da genetik alışveriş yaparak direnç genleri alan herhangi bir bakteri bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç yeteneği kazanabilir. Bakteriler zamanla çoklu direnç özellikleri kazandıklarından birçok farklı antibiyotiğe karşı direnç gösterebilirler.

Antibiyotik direncinin yayılımı:

Antibiyotik direnci genetik olarak, bakteri popülasyonlarında, hem yeni nesillere antibiyotik direnç genleri geçtiğinde "dikey olarak" veya bakteriler genetik materyalinin bir kısmını

diğer bakterilerle paylaştığında "yatay olarak" yayılır. Yatay gen aktarımı, farklı bakteri türleri arasında bile oluşabilir.

Çevresel nedenden kaynaklı antibiyotik direnci, bakterilerin bir yerden bir yere taşınmaları ile yayılır; bakteriler uçak, su ve rüzgâr yoluyla taşınabilirler. İnsanlar ise dirençli bakterileri başka bireylere temas veya damlacık yoluyla bulaştırabilmektedir.

İntrinsik (doğal) direnç kromozomal DNA üzerindeki genler tarafından eksprese edilen ve türün bütün bireylerinde bulunan direnci ifade ederken, **ekstrinsik (kazanılmış) direnç** türün bazı bireylerinde mevcut olup hareketli genetik elemanların horizontal transferiyle ya da antibiyotik maruziyeti sonucu seleksiyon ile oluşan direnci tanımlamaktadır. Enterokoklar intrinsik veya kazanılmış olarak birçok antibiyotiğe çok farklı mekanizmalarla oldukça yüksek düzeylerde direnç gösterebilen mikroorganizmalardır.

DNA bağımlı RNA polimerazın beta alt birimine (RpoB) bağlanıp transkripsiyonun başlamasını önleyerek bakteri büyümesini inhibe eden **rifampisin** her ne kadar enterokok enfeksiyonlarında tercih edilen bir bileşik olmasa da, direnci oldukça yaygındır ve beta alt birimini kodlayan *rpoB* genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır [84].

Folat sentez yolağında birbirini izleyen dihidrofolat sentezi ve bunun tetrahidrofolata dönüşümünü inhibe eden trimetoprim ve sulfametoksazol kombinasyonu (**ko-trimoksazol**) *in vitro* koşullarda folat içermeyen besi ortamında enterokoklara karşı etkili görünse bile, enterokoklar ortamdan folat absorbe edebildiklerinden dolayı tedavide kullanışsızdır [85–88].

2.6.1. Beta laktam direnci

Beta laktam grubu antibiyotikler, hücre duvarı biyosentezi sırasında yapıcı pentapeptit öncülüne benzerliklerinden dolayı penisilin bağlayan proteinlere (**Pbp**) bağlanarak bu enzimlerin inaktive olmasına, böylece hücre duvar sentezinin inhibisyonuna neden olurlar. *E. faecium* Pbp5, *E. faecalis* ise Pbp4 adlı düşük afiniteli Pbp'ler sentezlediğinden dolayı sefalosporinlere intrinsik olarak direnç gösterirler. Karbapenemlerde azalmış etkinlik görülürken, duyarlı suşlara karşı en iyi aktivite penisilinlerde gözlenmektedir. Mutasyona

uğramamış düşük afiniteli Pbp'lerin aşırı üretimi, enterokokların penisilinlere düşük düzeyde direnç gösterdiği nispeten nadir bir mekanizmadır [89–91].

Enterokoklarda intrinsik sefalosporin direncine Pbp mekanizmasının yanı sıra CroRS ve IreK regülatör sistemleri neden oldukları stres yanıtlarıyla, ayrıca transmembran serin/treonin kinaz ve MurAA enzim modifikasyonları da katkıda bulunmaktadır [92–94].

Ampisiline karşı ise kromozomal DNA'da yer alan ve konjugatif olarak aktarılabilen *pbp5* ekspresyonu ile gözlenen orta-yüksek düzey direncin yanı sıra; peptidoglikan sentezinde Pbp'lerin gerçekleştirdiği D,D-transpeptidasyona alternatif olarak L,D-transpeptidaz ekspresyonu sonucu orta düzey direnç hem intrinsik, hem de kazanılmış olarak gözlenebilmektedir [95, 96].

2.6.2. Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci

Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler ribozomun 50S alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Makrolid ve linkozamid grubu antibiyotikler enterokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılsa da bu bileşiklere karşı direnç oldukça yaygındır. Enterokoklarda makrolid grubu antibiyotiklere direnç, ribozomun 50S alt birimindeki 23S rRNA modifikasyonu aracılığı ile gerçekleşmektedir. *ermB* geni tarafından kodlanan bu fenotip MLS_B olarak adlandırılmaktadır. Bazı suşlarda aktarılabilen *mefA* geni ile makrolidleri hücre dışına atan bir pompa olsa da bunun sağladığı direnç daha zayıftır [97].

ATP bağlayan kaset pompasına benzer bir yapıya sahip olup *lsa* geniyle kontrol edilen pompa yardımıyla linkozamidlerden klindamisin, streptogramin B sınıfından kinupristin ve streptogramin A sınıfından dalfopristin hücre dışına atılmaktadır. Bu genin incelenen bütün *E. faecalis* suşlarında görülüp hiçbir *E. faecium* suşunda görülmemesi, *E. faecalis*'in bu bileşiklere gösterdiği intrinsik direnci açıklamaktadır [98].

2.6.3. Oksazolidinon direnci

Linezolid, tamamı sentetik olan ve ribozomun 50S alt biriminde 23S rRNA'ya bağlanarak protein sentezini inhibe eden oksazolidinon sınıfı antibiyotiklerden ilkidir. Birçok bakteri 23S rRNA'yı kodlayan genin birden çok kopyasını taşımakta olup, bu genden *E. faecalis*'te

dört, *E. faecium*'da altı adet bulunmaktadır. Sporadik mutasyonlarla bu genin ne kadar çok kopyası değişirse direncin o derece yüksek olduğu klinik izolatlarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [99]. Nokta mutasyonlarının yanı sıra enterokoklarda kazanılmış linezolid direncine sebep olan bir mekanizma daha aydınlatılmıştır: 23S rRNA'da linezolidin bağlandığı bölgede bir adenozini metilleyen metiltransferazı kodlayan ve ilk olarak *Staphylococcus aureus*'ta keşfedilmiş olan *cfr* geni, yeni bir plazmit üzerinde *E. faecalis*'te de bulunmuş ve dirence yol açtığı saptanmıştır [100].

2.6.4. Aminoglikozit direnci

Aminoglikozitler ribozomun 30S alt biriminde 16S rRNA'ya bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Hücre duvarına etki eden ajanlarla yapılan çalışmalarda hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*'da görülen intrinsik aminoglikozit direncinin, hücre duvarının düşük aminoglikozit geçirgenliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bazı suşlarda bu mekanizmayla oluşan streptomisin direnciyle MİK değeri 500 µg/mL'ye kadar çıkmaktadır [101]. Bunun dışında bazı enterokoklar kromozomal genlerinde kodlanan bazı enzimlerle sinerjistik etki oluşmasını önlemekte ve aminoglikozitlere duyarlılığı azaltmaktadır. Aminoglikozit 6' asetiltransferaz (AAC(6')-Ii) ile tobramisin ve kanamisine yüksek derecede; *efmM* tarafından kodlanan metiltransferaz ile dibekasin, tobramisin ve kanamisine düşük derecede direnç gözlenmektedir [102, 103]. Ayrıca birçok klinik izolatta rastlanan ve fosfotransferaz aktivitesi gösteren APH(3')-IIIa enzimi ile kanamisin ve amikasin direnci görülmüştür [104].

2.6.5. Daptomisin direnci

Lipopeptit yapıları antibiyotiklerden daptomisin (DAP) molekülleri, kalsiyum iyonları varlığında hücre membranına penetre olur ve oligomerleşerek membranın dışından içine doğru uzanır. DAP kompleksinin oluşturduğu por yapısı membranın bütünlüğünü bozarak bazı fonksiyonlarının aksamasına, çeşitli iyonların sızmasına ve hücre ölümüne sebep olur [105]. Daptomisine karşı *E. faecium* suşlarında *E. faecalis*'e göre daha fazla direnç gözlenmekte olup; daptomisin direnci Amerika'da, Asya ve Avrupa'da olduğundan daha yaygındır [106]. Yapılan çalışmalarda hücre membranındaki proteinleri etkileyen ve sırasıyla *cls*, *gdpD* ve *liaFSR* tarafından kodlanan kardiyolipin sentetaz, gliserofosforil

diester fosfodiesteraz ve lipid-II ilişkili antibiyotik peptit regülatör sistemindeki mutasyonlarla enterokokların daptomisine direnç gösterdikleri bulunmuştur [107, 108].

2.6.6. Kinolon direnci

Enterokoklar kinolon grubu antibiyotiklere düşük düzeyde intrinsik direnç göstermelerinin yanı sıra, çeşitli mekanizmalarla yüksek düzeyde direnç kazanabilirler. Kinolonlar DNA'nın süpersarmal yapıya geçmesini sağlayan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek replikasyonu önler. DNA giraz ikişer GyrA ve GyrB alt biriminden, topoizomeraz IV ise ikişer ParC ve ParE alt biriminden oluşmaktadır. Sırasıyla GyrA ve ParC enzimlerini kodlayan *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlarla ortaya çıkan kinolon direnci *E. faecalis* ve *E. faecium*'da tanımlanmış, ancak *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*'da görülmemiştir [109, 110]. Enterokoklarda mutasyonların dışında *E. faecalis* V583 genomunda kodlanan çoklu antibiyotik direnci sağlayan efflux pompası ve pentapeptit tekrarlarından oluşan Qnr proteinleri ile ilacın hedef bölgesine afinitesinin azaltılması gibi mekanizmalarla da kinolonlara direnç gelişimi gözlenmiştir [111, 112].

2.6.7. Glikopeptit direnci

İlk kez 1986 yılında vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid antibiyotiklerine plazmit aracılığıyla kazanılmış direnç gösterilmiştir. Glikopeptid dirençli enterokokların geniş bir coğrafi dağılım ve fenotipik ve genotipik bir heterojenite gösterdiği belirlenmiştir.

Glikopeptit grubu antibiyotiklerden vankomisin ve teikoplanin, gram pozitif bakterilerin hücre duvarı biyosentezi sırasında peptidoglikan öncülünün pentapeptit yan zincirinin D-Ala-D-Ala ucuna yüksek afiniteyle bağlanarak transglikozilasyon (polimerizasyon) ve transpeptidasyon (çapraz bağlanma) basamaklarını inhibe eder. Glikopeptit direnci pratikte vankomisin direnci olarak anılır ve mikroorganizmaların bu antibiyotiklerin hedefini değiştirmesiyle görülür.

Çizelge 2.2. Vankomisin direnç fenotipleri ve özellikleri

Fenotip	Aminoasit değişimi	Teikoplanin MİK (µg/mL)	Vankomisin MİK (µg/mL)	Taşındığı eleman	Transfer	Direnç tipi
VanA	D-Ala-D-Lac	16-512	64-1000	Tn1546, Tn5482, Tn5506	Evet	İndüklenebilir yüksek
VanB	D-Ala-D-Lac	≤0,5	4-512	Tn1547 (<i>vanB1</i>); <i>ICESluvan</i> , Tn5382, Tn1549 (<i>vanB2</i>)	Evet	İndüklenebilir yüksek
VanC1, VanC2, VanC3	D-Ala-D-Ser	≤0,5	2-32		Hayır	İntrinsik zayıf
VanD	D-Ala-D-Lac	4-32	64-256		Hayır	İndüklenebilir
VanE	D-Ala-D-Ser	≤0,5	16	Tn6202 (<i>vanE</i>)	Hayır	İndüklenebilir
VanG	D-Ala-D-Ser	≤0,5	≤16			İndüklenebilir
VanL	D-Ala-D-Ser	S	8			İndüklenebilir
VanM	D-Ala-D-Lac	Yüksek	>256			İndüklenebilir
VanN	D-Ala-D-Ser	≤0,5	16			İntrinsik

Bugüne kadar 9 farklı glikopeptit direnç tipi ve bunlardan sorumlu 9 gen kümesi keşfedilmiş olup, isimlendirmelerinde kodladıkları ligazlar esas alınmıştır. VanA, VanB, VanD ve VanM tipi dirençte D-Ala-D-Ala terminali yerine D-Ala-D-Lac senteziyle glikopeptit afinitesi yaklaşık 1000 kat azalmakta ve yüksek düzeyde direnç (MİK>256 µg/mL) gözlenmektedir. VanC, VanE, VanG, VanL ve VanN tipi dirençte ise D-Ala-D-Ser senteziyle glikopeptit afinitesi yaklaşık 7 kat azalmakta ve orta yüksek düzeyde direnç

(MİK: 8-16 µg/mL) gözlenmektedir. Pentapeptit öncüllerindeki bu değişiklikler peptidoglikan biyosentezinde görev alan enzimlerin afinite ve fonksiyonunu etkilememektedir.

Van operonları başlıca üç fonksiyon kodlar. Bunlardan ilki indüklenebilen direnç tiplerinde glikopeptit varlığını algılayarak direnç genlerinin ekspresyonunu aktive eden iki bileşenli regülatör sistemidir. İkincisi uygun substratı (D-Lac veya D-Ser) sentezlemede ve D-Ala ile birleştirerek dipeptit oluşumunu sağlamada kullanılan enzimlerdir. Sonuncusu da hücrenin doğal biyokimyasal yolları ile sentezlediği modifiye edilmemiş peptidoglikan öncüllerini elimine ederek, hücre duvarının tamamen modifiye bileşenlerle oluşturulmasını sağlayan enzimlerdir.

VanA fenotipi

Hastane enfeksiyonlarından izole edilen enterokoklarda en sık karşılaşılan glikopeptit direnç fenotipi olup, hem vankomisin hem de teikoplanine yüksek düzeyde dirençten sorumludur. Glikopeptitlere yüksek düzeyde direnç duyarlı enterokoklara plazmitler aracılığıyla konjugasyonla aktarılır. Ayrıca hem konjugatif, hem de konjugatif olmayan plazmitlerde bulunabilen ve Tn3 grubu transpozonlardan olan Tn1546, klinik enterokok izolatları arasında yüksek düzeydeki glikopeptit direncinin yayılımından sorumludur. Tn1546 en sık *E. faecalis* ve *E. faecium*'da görülür. 10851 bp uzunluğundadır ve dört fonksiyonel grubu belirleyen dokuz polipeptit kodlar: transpozisyon fonksiyonları (açık okuma çerçeveleri ORF1 ve ORF2), vankomisin direnç genlerinin regülasyonu (VanR ve VanS), glikopeptit direnci (VanH, VanA ve VanX) ve peptidoglikan sentezinde rol oynayan fakat glikopeptit direncinde gerekli olmayan yardımcı proteinler (VanY ve VanZ) [113].

İlgili enzimleri *vanA* gen kümesi üzerinde bulunan *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* ve *vanZ* genleri tarafından kodlanır: *vanRS* iki bileşenli regülatör sisteminin kodladığı VanS (sensör kinaz) ve VanR (yanıt regülatörü) mekanizmayı kontrol eder. VanH (dehidrojenaz) pirüvatı laktata çevirir, VanA (ligaz) ise D-Ala-D-Lac dipeptidini oluşturur. VanX (dipeptidaz) D-Ala-D-Ala'yı keserek ve VanY enzimleri (D,D-karboksipeptidazlar) bunları parçalayarak doğal peptidoglikan öncüllerini elimine eder. Yedinci gen olan *vanZ*'nin fonksiyonu halen tam olarak aydınlatılamamıştır [113].

VanB fenotipi

VanA'dan sonra en sık karşılaşılan fenotip olup, genellikle Tn5382/Tn1549 tipi hem kromozom hem de plazmit üzerinde bulunabilen transpozonlarla taşınmaktadır. Regülatör enzimleri VanS_B ve VanR_B yapıcı vanA enzimlerine oldukça benzese de, VanS_B teikoplanin varlığında aktive olmadığı için bu direnç tipinde yalnızca vankomisine yüksek direnç görülür. Ancak *vanS_B* mutasyonları ya da VanS_B'nin sürekli çalışması gibi durumlarda teikoplanine de direnç görüldüğü bildirilmiştir [114]. VanB'de ayrıca *vanZ* geni bulunmamakta olup, yerine fonksiyonu bilinmeyen *vanW* geni vardır.

VanC fenotipleri

VanC1, VanC2 ve VanC3 alt tipleri bulunan VanC direnci *E. gallinarum*, *E. flavescens* ve *E. casseliflavus* türlerinin kromozomal DNA'larında kodlanmakta olup, peptidoglikan öncüllerindeki D-Ala-D-Ala'nın D-Ala-D-Ser'e dönüşümüyle düşük düzeyde intrinsik vankomisin direnci oluşturur. Bu türler D-Ala-D-Ser dipeptidini oluşturabilmek için bir serin rasemaz enzimi olan VanT L-serini D-serine dönüştürmektedir [115].

2.7. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Hastanelerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılan rutin taramalarda disk difüzyon yöntemi ile yapılan ön duyarlılık testlerinin ardından agar besiyerlerinde minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) tayininde ETEST® kitleri kullanılmaktadır. Otomatize yöntemlerin yanı sıra kantitatif sonuçlar elde etmek için araştırma laboratuvarlarında en çok sıvı besiyerinde mikrodilüsyon yönteminden faydalanılmaktadır.

2.8. Enterokokların Yol Açtığı Enfeksiyonlar

Son yıllarda enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar hızla artmakta ve hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler arasında giderek önem kazanmaktadır. Enterokoklar üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, endokardit, peritonit, safra yolu enfeksiyonları, karın içi abseleri, bakteriyemi ve bazen menenjit gibi ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadırlar.

Enterokok kaynaklı enfeksiyonların % 90'ından fazlasında *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* sorumludur. İnsanlarda enfeksiyona neden olduğu bilinen diğer enterokok türleri *Enterococcus avium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus* ve *Enterococcus mundtii*'dir. *E. faecium* vankomisine dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonlarının çoğunluğundan sorumludur [116].

2.8.1. Üriner sistem enfeksiyonları

Enterokokların en yaygın oluşturduğu enfeksiyon tipi çoğunlukla hastane kaynaklı olan üriner sistem enfeksiyonlarıdır. Komplike olmayan sistit, piyelonefrit, prostatit ve renal abselere neden olabilen etmenlerdendir. Enterokokal sistit, prostatit, epididimit gibi alt idrar yolu enfeksiyonları yaşlı erkeklerde daha sık gözlenmekte olup; genç kadınlarda komplikasyonsuz olarak çok nadir görülmektedir. Bu durumdan bekleneceği üzere bakteriyemiye yol açan üst idrar yolu enfeksiyonları da en çok yaşlı erkeklerde görülmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde görülen idrar yolu enfeksiyonlarının yaklaşık %15'ine enterokoklar yol açmaktadır.

2.8.2. Endokardit

E. faecalis ve *E. faecium*'un yol açtığı en ölümcül enfeksiyonlardan olan endokarditin en yaygın üçüncü nedeni yaklaşık %15'lik prevalansıya enterokoklardır [117]. Bu olgularda *E. faecalis* ile *E. faecium*'dan daha fazla karşılaşılmaktadır. Yaşlı bireylerde daha fazla görülen kalp kapağı enfeksiyonlarının birincil nedeni genellikle genitoüriner ya da gastrointestinal kanaldaki enterokok kolonizasyonudur, kalp kapağı protezi operasyonu geçiren hastalarda prevalansı giderek artmaktadır. Enterokokal endokarditte klinik tablo genellikle ani gelişen emboliden ziyade kalp yetmezliğiyle sonuçlanan subakut enfeksiyon şeklinde olup, diğer enfektif endokardit olgularından daha düşük mortaliteye neden olmaktadır. Enterokokal endokardit, nispeten duyarlı suşlardan kaynaklansa bile zor tedavi edilmekte olup, ikili antibiyotik tedavisi gerektirebilmektedir. Vankomisin ya da yüksek düzey aminoglikozit direnci varlığında ise enfekte kapakçığın opere edilmesi gerekebilmektedir.

2.8.3. Bakteriyemi

Hastane kaynaklı bakteriyeminin en yaygın ikinci nedeni olan enterokoklar kan dolaşımına genellikle sindirim sisteminden geçmekte olup genitoüriner, intraabdominal ya da yumuşak doku enfeksiyonlarından da kaynaklanabilmektedir. Enterokokal bakteriyemiler, *Staphylococcus aureus*'un aksine nadiren uzak organlara sıçramakta ya da metastatik abseler oluşturmaktadır. Bu enfeksiyonlarda en büyük problem genellikle eşlik eden endokardit olmaktadır. Bakteriyemilerde *E. faecium*'un mortalitesi *E. faecalis*'ten çok daha yüksektir.

2.8.4. Yumuşak doku, abdomen ve pelvis enfeksiyonları

Bu vakalarda enterokoklar genellikle birden fazla mikroorganizmayla bir arada gözlenmektedir. Klinik açıdan önemleri tartışmalı olsa da, birçok hekim bakteriyemiden kaçınmak için sıkı tedavi rejimleri uygulamayı tercih etmektedir. Abselerin boşaltılması ve yaraların temizlenmesi bu bölgelerde oluşan enfeksiyonların tedavisi için önemlidir. Peritonit vakalarında ise enterokoklar sık gözlenmemelerine rağmen monomikrobiyal enfeksiyonlara yol açabilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Besiyeri ve Çözeltiler

3.1.1. Müller Hinton sıvı besiyeri

1 litresinde 2 g et infüzyonu, 17,5 g kazein hidrolizati ve 1,5 g nişasta içerir.

Hazırlanışı: 21 g Mueller-Hinton Broth (Merck) tartılarak 1 litre demineralize suda süspande edilir. Tüplere dağıtılır ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır.

3.1.2. Müller Hinton katı besiyeri

1 litresinde 2 g et infüzyonu, 17,5 g kazein hidrolizati, 1,5 g nişasta ve 13 g agar içerir.

Hazırlanışı: 34 g Mueller-Hinton Agar (Merck) tartılarak 1 litre demineralize suda süspande edilir. 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. 45-50 °C'ye soğuduğunda steril petri kaplarına dağıtılır.

3.1.3. Koyun kanlı agar

%5 koyun kanlı Müller Hinton Agar (Biomerieux) hazır olarak tedarik edilmektedir.

3.1.4. Polimeraz zincir reaksiyonu solüsyonları

10X PZR tamponu, 25 mM MgCl₂, 25'er mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı ve 5 U/μL Taq DNA Polimeraz (GeneON) derin dondurucuda saklanmıştır. Primer dizileri aşağıdaki gibidir:

vanA: PZR ürün büyüklüğü 732 bç (*Tn1546*: 7154-7170, 7869-7885 bç. GenBank: M97297.1)

A1: GGGAAAACGACAATTGC

A2: GTACAATGCGGCCGTTA

vanB: PZR ürün büyüklüğü 635 bp

B1: ATGGGAAGCCGATAGTC

B2: GATTTCGTTCTTCGACC

3.1.5. Tris- Borik asit- EDTA (TBE) tamponu

10X TBE stok solüsyonu: 108 g tris(hidroksimetil)aminometan (Merck), 55 g borik asit (Merck) ve 7,5 g disodyum EDTA (Merck) tartılır, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde 800 mL kadar distile suda çözündürülür. Partiküller tamamen çözüldükten sonra distile suyla 1000 mL'ye tamamlanır ve pH=8,3'e ($\pm 0,1$) ayarlanır. Hazırlanan solüsyonun oda sıcaklığında karanlıkta saklanması presipitasyonu azalttığından raf ömrünü uzatır.

1X TBE çalışma solüsyonu: Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez tankında kullanılır. 10X TBE tamponununun 1:10 oranında seyreltilmesiyle hazırlanır.

3.2. Yöntem

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na hastanenin çeşitli servislerinden mikrobiyolojik analizler için gönderilen klinik örneklerden (idrар, kan, feçes, çeşitli sürüntüler vb.) glikopeptit dirençli enterokok (VRE) olarak tanımlanmış izolatlarda vankomisin direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle belirlenmiştir.

3.2.1. Vankomisin dirençli enterokokların belirlenmesi

Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na rutin taramalar için gelen klinik materyalde bulunması muhtemel patojenin izole edilebilmesi için öncelikle uygun bir besiyerine ekimi yapılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan izolatların tümü %5 koyun kanlı agarda üremiştir.

İlk inkübasyonun ardından örnekler VITEK® MS otomatize tanılama sisteminde kütle spektrometresi ile analiz edilmiş ve tür düzeyinde tanımlanmıştır. Enterokok olduğu belirlenen örneklerin ampisilin, penisilin, sefalekssin, seftriakson, vankomisin, teikoplanin, rifampisin, linezolid, gentamisin, fosfomisin, eritromisin, ofloksasin, levofloksasin,

siprofloksasin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere duyarlılıkları otomatize olarak VITEK 2 sistemiyle belirlenmiştir.

3.2.2. İzolatların saklanması

Vankomisin dirençli olduğu belirlenen enterokok örneklerinden birkaç koloni Müller-Hinton sıvı besiyeri ve seramik boncuklar içeren steril kriyotüplere alınıp iyice karıştırılmış, 15 dakika inkübasyonun ardından santrifüjlenmiştir. Ardından sıvı besiyeri steril bir pipetle çekilmiştir. Boncukların yüzeyinde tutunan mikroorganizmalar derin dondurucuda uzun süre saklanabilmektedir.

3.2.3. Örnek seçim kriterleri

Ocak 2011- Aralık 2017 tarihleri arasında VRE olarak tanımlanan 179 izolatın servis ve antibiyogram bilgileri incelenmiştir. Bir hastadan aynı VRE enfeksiyonu süresince alınan mükerrer örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. 2 µg/mL vankomisinli besiyerinde üremeyen suşlar vankomisine direnç göstermedikleri düşünülerek çalışmanın dışında tutulmuştur. Vankomisin direnç genlerinin belirlenmesi için 107 izolat gerekli kriterleri sağlamıştır.

3.2.4. İzolatların pasajlanması

Derin dondurucuda kriyotüpler içinde seramik boncuklar üzerinde saklanan izolatların bozulmaması için çalışılacak örnekler belirlenmiş, bekletilmeden buldukları tüpler aseptik ortamda açılarak steril pens ile içlerinden birer boncuk alınmış ve dondurucuya geri yerleştirilmiştir. Boncuklar 2 µg/mL vankomisinli Müller Hinton katı besiyerini inoküle etmede kullanılmıştır. İnoküle edilen petri kapları 37°C'lik etüve yerleştirilerek bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5. Bakteriye DNA eldesi

İzolatların total DNA'sı kaynatma yöntemiyle elde edilmiştir. Taze katı kültürden birkaç koloni alınarak üzerine 500 µL steril distile su eklenmiş, 10 dakika kaynatılıp sonra santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım atılmış ve total DNA'nın içinde bulunduğu çökelti 250 µL steril

distile suda süspande edilmiştir. İzole edilen DNA, eppendorf tüpler içinde derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu

vanA ve *vanB* direnç genlerinin varlığının belirlenmesinde multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak glikopeptitlere duyarlı *E. faecalis* ATCC 29212 suşu, VanA pozitif kontrol olarak *E. faecalis* BM4147 suşu, VanB pozitif kontrol olarak *E. faecalis* V583 suşu kullanılmıştır.

200 µL'lik DNAaz ve RNAaz içermeyen steril tüplere dağıtılan 45'er µL ana PZR karışımının üzerine 5'er µL kalıp DNA eklenmiştir. Hazırlanan tüpler ısı döngü cihazına (Boeco) yerleştirilerek PZR gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. PZR karışımı

Bileşen	İstenen miktar	Eklenen hacim
10X tampon	1X	5 µL
25 mM MgCl ₂	1,5 mM	3 µL
dNTP karışımı	0,25 mM (her biri)	0,25 µL
Primer karışımı (<i>vanA</i> + <i>vanB</i>)	0,5 mM (her biri)	1+1 µL
Taq DNA Polimeraz	1,25 U	0,25 µL
Kalıp DNA	1-10 ng	5 µL
Su	Yeterli miktarda	36,5 µL
TOPLAM		50 µL

Çizelge 3.2. PZR koşulları

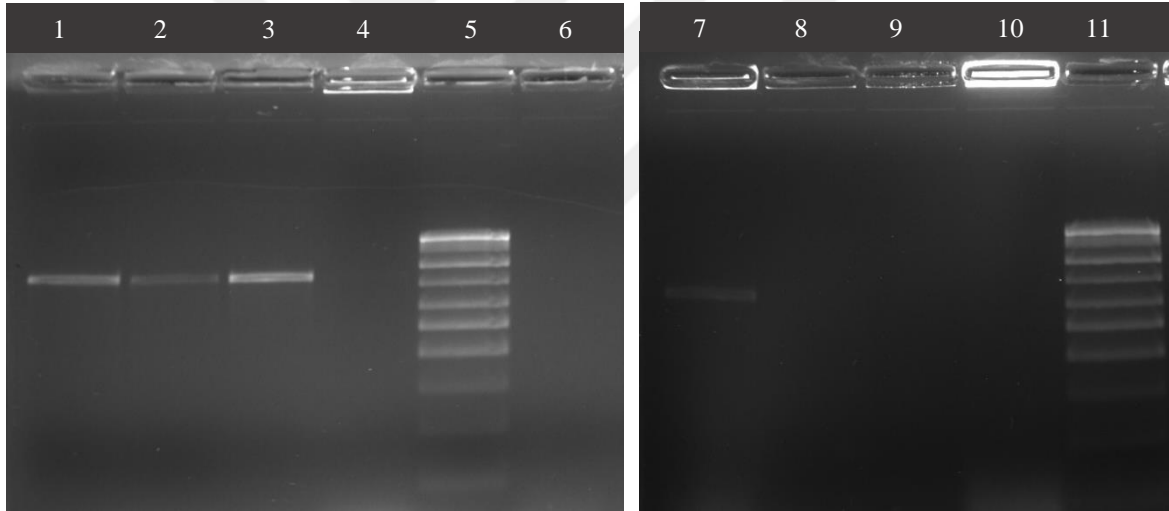
Basamak	Sıcaklık	Süre
Ön denatürasyon	94 °C	2 dk
Denatürasyon	95 °C	1 dk
Bağlanma	57 °C	1 dk
Uzama	68 °C	1 dk
Son uzama	72 °C	10 dk

30
döngü

3.2.7. Amplifiye ürünlerin değerlendirilmesi

Amplifiye ürünler % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. 2 gram agaroz (Difco®), 1X TBE tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır. Isıtma ile akışkan ve tamamen homojen hale geldikten sonra 10 mikrolitre etidyum bromür çözeltisi eklenir. İyiye karıştırılır, tarakların yerleştirildiği kalıba dökülür. Soğuduktan sonra taraklar çıkarılır ve TBE tamponuyla doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirilir.

PZR ürünlerinden 5'er µL alınarak, 5'er µL bromfenol mavisi çözeltisiyle karıştırılır ve jele yüklenir. Belirteç olarak 100-1000 bp DNA Ladder (GeneOn®) uygun kuyucuklara yüklenir. Tankın kapağı kapatılarak belirteç yeterince açılana kadar 80V gerilim uygulanır. Translüminatörde belirteç ve ürünlerin ilerleyişi takip edilir.



Resim 3.1, 3.2. Agaroz jel elektroforezi görüntüleri: (1) *vanA* kontrol, (2,3,4) *vanA* pozitif (7) *vanB* kontrol, (5,11) 100-1000 bç belirteç

Belirtilen prosedürle yüklenen ve yürütülen jellerin görüntüleri Kodak GelLogic 200 kamera ve Kodak MI yazılım kullanılarak çekilmiş ve bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Belirtecın 700-800 bç arasına denk gelen bantlar *vanA* (732 bç), 600-700 bç arasına denk gelen bantlar *vanB* (635 bç) pozitif olarak yorumlanmıştır.

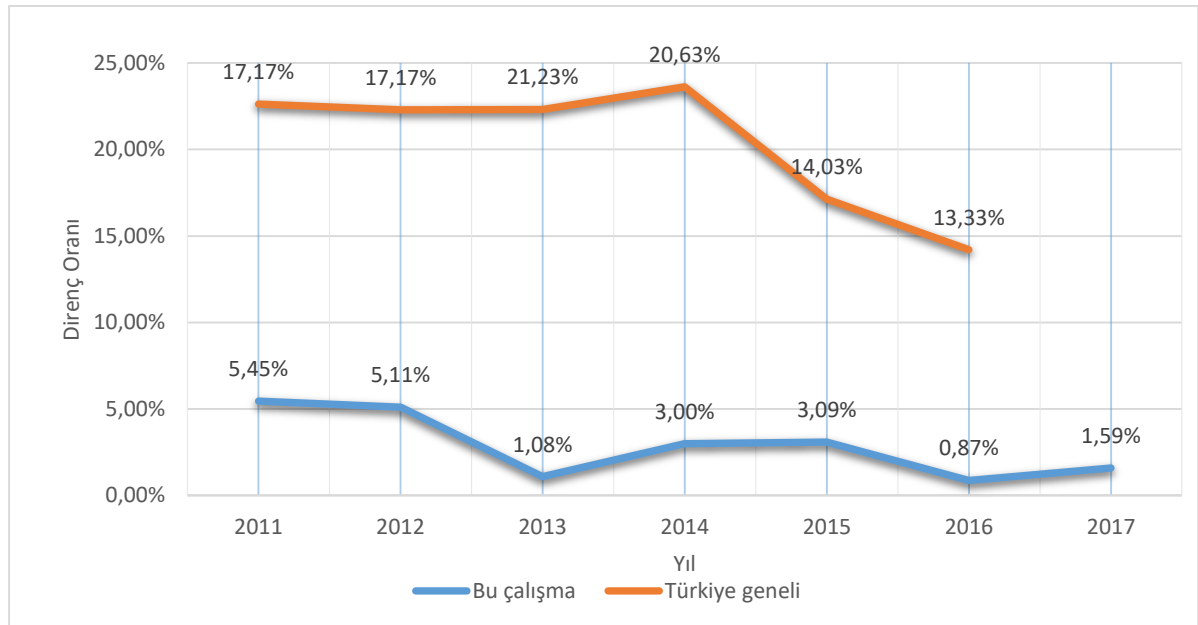


4. BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılan rutin mikrobiyolojik taramalar sırasında 2011-2017 yılları arasında toplam 98710 bakteri örneği izole edilmiş olup, bunların 7551'i (%7,65) enterokok olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda 179 (%2,37) örneğin vankomisin dirençli enterokok (VRE) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bulunan direnç oranları Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı bünyesindeki Halk Sağlığı Kurumu'nun yayınladığı sürveyans verilerindeki direnç oranları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Enterokok izolatlarının yıllara göre dağılımı

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	TOPLAM
Toplam izolat sayısı	11866	9961	14482	11264	12324	12857	14504	98710
Enterokok sayısı	789	528	1573	899	971	1151	1260	7551
Enterokok prevalansı	%6,65	%5,30	%10,86	%7,98	%7,88	%8,95	%8,69	%7,65
VRE sayısı	43	27	17	27	30	10	20	179
Direnç oranı	%5,45	%5,11	%1,08	%3,00	%3,09	%0,87	%1,59	%2,37

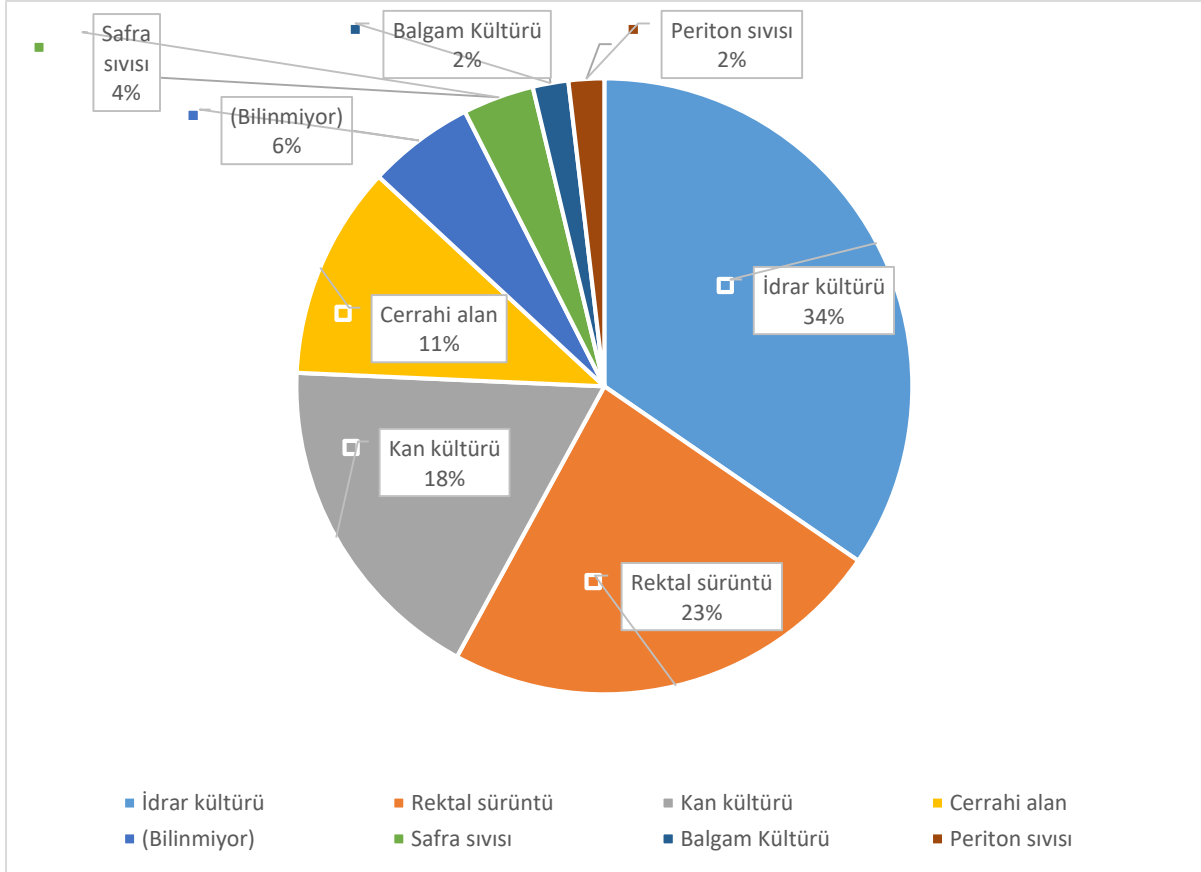


Şekil 4.1. Türkiye genelinde ve bu çalışmada 2011-2017 yılları arasında belirlenen enterokoklarda vankomisin direnç oranları [118–123]

VRE olarak tanımlanan 179 izolatin 107'si genotip analizi için seçilmiştir (Bkz: Bölüm 3.2.3). Seçilen örneklerin 37'si (%34,58) idrar kültürü, 25'i (%23,36) rektal sürüntü, 19'u (%17,75) kan ve 12'si (%11,21) yara ile cerrahi alan sürüntülerinden; kalanı ise periton sıvısı, safra, balgam gibi kaynaklardan elde edilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. Klinik materyal tipine göre VRE suşları

	Adet	%
Balgam kültürü	2	1,87
<i>Enterococcus faecium</i>	2	
Yara/ cerrahi alan sürüntüsü	12	11,21
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	
<i>Enterococcus faecium</i>	5	
<i>Enterococcus spp.</i>	4	
İdrar kültürü	37	34,58
<i>Enterococcus avium</i>	1	
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	
<i>Enterococcus faecium</i>	16	
<i>Enterococcus hirae</i>	1	
<i>Enterococcus raffinosus</i>	1	
<i>Enterococcus spp.</i>	14	
Kan kültürü	19	17,75
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
<i>Enterococcus faecium</i>	12	
<i>Enterococcus hirae</i>	1	
<i>Enterococcus spp.</i>	5	
Periton sıvısı	2	1,87
<i>Enterococcus faecium</i>	1	
<i>Enterococcus spp.</i>	1	
Rektal sürüntü	25	23,36
<i>Enterococcus avium</i>	2	
<i>Enterococcus faecium</i>	15	
<i>Enterococcus spp.</i>	8	
Safra sıvısı	4	3,74
<i>Enterococcus faecium</i>	2	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	
<i>Enterococcus spp.</i>	1	
(Bilinmiyor)	6	5,60
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	
<i>Enterococcus faecium</i>	3	
<i>Enterococcus spp.</i>	2	
Genel Toplam	107	%100



Şekil 4.2. VRE izole edilen klinik materyal tipleri

Çalışılan 107 VRE izolatının 56'sı (%52,34) *Enterococcus faecium*, 7'si (%6,54) *E. faecalis*, 3'ü (%2,80) *E. avium* olarak tanımlanmış olup, bunların dışında 2'şer adet *E. casseliflavus* ve *E. hirae*; 1'er adet de *E. gallinarum* ve *E. raffinosus* suşuna rastlanmıştır. (Çizelge 4.2, 4.3).

Çizelge 4.3. İzolatların türüne göre *vanA* geni varlığı

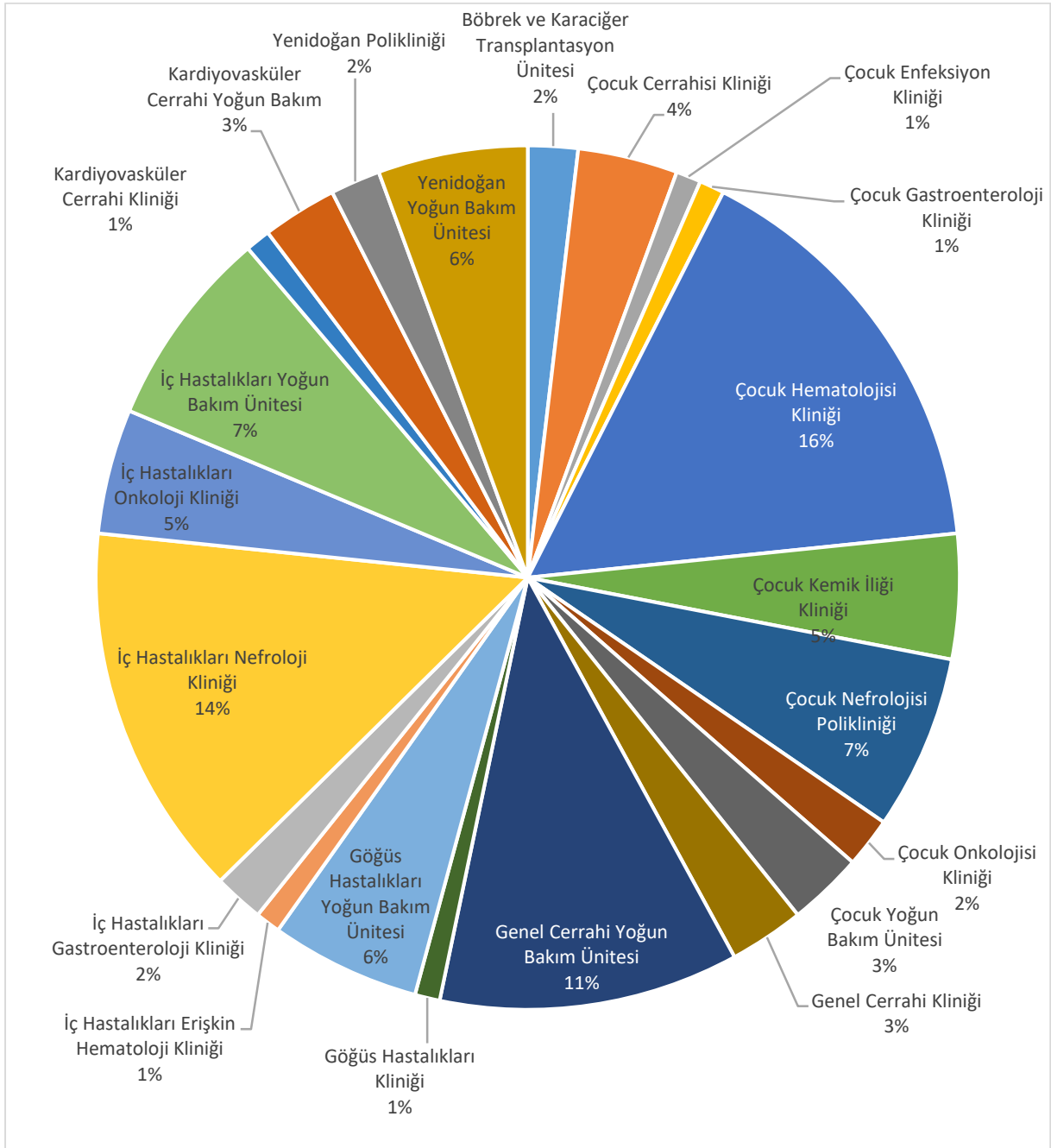
Bakteri Türü	VanA (+)		Toplam	
	n	%	n	%
<i>Enterococcus faecium</i>	52	48,60	56	52,34
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	4,67	7	6,54
<i>Enterococcus avium</i>	3	2,80	3	2,80
<i>Enterococcus casseliflavus</i>			2	1,87
<i>Enterococcus hirae</i>	2	1,87	2	1,87
<i>Enterococcus gallinarum</i>			1	0,93
<i>Enterococcus raffinosus</i>	1	0,93	1	0,93
<i>Enterococcus spp.</i>	33	30,84	35	32,71
Genel Toplam	96	89,72	107	100

Çalışılan izolatların 96'sında (%89,72) *vanA* geni saptanmış olup, yalnızca bir (%0,93) *E. faecium* suşunda *vanB* geni tespit edilmiştir. *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* suşlarında da *vanA* ve *vanB* direnç genleri araştırılmış, ancak hiçbirinde bu genlere rastlanmamıştır. *E. avium*, *E. hirae* ve *E. raffinosus* suşlarının tümünün *vanA* geni taşıdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.4. Servislerdeki VRE sayı ve yüzdeleri; VanA ve VanB pozitif izolat sayıları

Bölüm	Toplam izolat		VanA	VanB
	n	%	(+)	(+)
Böbrek ve Karaciğer Transplantasyon Ünitesi	2	1,87	2	
Çocuk Cerrahisi Kliniği	4	3,74	4	
Çocuk Enfeksiyon Kliniği	1	0,93	1	
Çocuk Gastroenteroloji Kliniği	1	0,93	1	
Çocuk Hematolojisi Kliniği	17	15,89	17	
Çocuk Kemik İliği Kliniği	5	4,67	5	
Çocuk Nefrolojisi Polikliniği	7	6,54	4	1
Çocuk Onkolojisi Kliniği	2	1,87	2	
Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi	3	2,80	3	
Genel Cerrahi Kliniği	3	2,80	3	
Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi	12	11,21	11	
Göğüs Hastalıkları Kliniği	1	0,93	1	
Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi	6	5,61	5	
İç Hastalıkları Erişkin Hematoloji Kliniği	1	0,93	1	
İç Hastalıkları Gastroenteroloji Kliniği	2	1,87	1	
İç Hastalıkları Nefroloji Kliniği	15	14,02	11	
İç Hastalıkları Onkoloji Kliniği	5	4,67	4	
İç Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi	8	7,48	8	
Kardiyovasküler Cerrahi Kliniği	1	0,93	1	
Kardiyovasküler Cerrahi Yoğun Bakım	3	2,80	3	
Yenidoğan Polikliniği	2	1,87	2	
Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi	6	5,61	6	
Genel Toplam	107	100	96	1

Özellikle yoğun bakım üniteleri, hematoloji-onkoloji servisleri ve transplantasyon merkezleri gibi yüksek riskli hasta popülasyonunun bulunduğu kliniklerde dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarına daha sık karşılaşılmıştır.



Şekil 4.3. VRE izolatlarının servislere göre dağılımı



5. TARTIŞMA

Dünyada klinik örneklerde ilk vankomisin dirençli enterokok suşu 1988 yılında İngiltere ve Fransa'dan rapor edilen *Enterococcus faecium* suşları olmuştur [124, 125]. Ertesi yıl ise Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk vankomisin dirençli *E. faecalis* izole edilmiştir [126]. Kısa bir süre içinde dirençli suşların yol açtığı enfeksiyonların sayısı büyük bir hızla artmış olup, epidemiyolojileri bölgelere göre farklılıklar göstermektedir [127]. Türkiye'de 1998 yılında ilk vankomisin dirençli enterokok (VRE) suşu Akdeniz Üniversitesi hastanesinde görülmüş olup, Vural ve arkadaşları tarafından VanA tipi direnç taşıdığı belirlenmiştir [128]. İkinci VRE olgusu olan ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nde bir lösemi hastasından izole edilen VanA pozitif *Enterococcus faecium* suşu 2000 yılında Başustaoğlu ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [129]. Takiben ülkenin çeşitli bölgelerinde VRE olguları görülmeye başlamıştır.

Türkiye'de 2004-2011 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılık oranları disk difüzyon ve VITEK2 yöntemleriyle incelenmiş ve glikopeptid direnç oranları gösterilmiştir [130–132]. Bazı araştırmalarda ise glikopeptid direncine rastlanmamıştır [133–135]. Moleküler tekniklerin kullanımının yaygınlaşması ve vankomisin dirençli enterokokların ülkemizde giderek artması nedeniyle VRE enfeksiyonlarında dirençten sorumlu *van* genlerini PZR yöntemiyle belirleyen çok sayıda araştırma yapılmıştır [136, 137].

2011'den itibaren Sağlık Bakanlığı bünyesindeki Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından düzenlenen Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) raporlarında yıllık olarak en yaygın yedi ciddi hastane enfeksiyonu etkeni ile ilgili epidemiyolojik veriler yayınlanmaktadır. Bu verilere göre Türkiye'de 2011-2012 yıllarında klinik enterokok suşlarında vankomisin direnci oranının %17 civarı olduğu görülmektedir. Bu oran 2013-2014 yıllarında %20'nin üstüne çıksa da, 2015-2016 yıllarında %15'in altında kalmıştır [118–123]. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde ise 2011-2012 yıllarında %5'in üstünde (sırayla %5,45 ve %5,11) olan direnç oranı ilerleyen yıllarda düşmüş (%1,08; %3,0; %3,09) ve 2016 yılında %0,87'ye kadar gerilemiştir. Direnç oranlarının ülke genelinden bu kadar düşük çıkması, hastane bünyesinde enfeksiyon kontrol politikalarının başarılı olduğunu düşündürmektedir.

Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (ECDC) benzer bir şekilde 2002'den bu yana önemli patojenlerin verilerini yayınlamaktadır. ECDC verilerine göre klinik *E. faecalis* izolatlarında vankomisin direnci 2002'den beri %1'in altında kalmıştır. *E. faecium* direnç yüzdesi ise 2006 yılına kadar %1'in altında kalmış, 2010 yılından itibaren ise %7'nin üstüne çıkarak %7-9 arasında dalgalanmaya başlamıştır. Ülkeler düzeyinde incelendiğinde klinik *E. faecium* izolatlarında vankomisin direnci İskandinav ülkelerinde sıfır ya da sıfıra yakın bulunurken, direncin en yaygın olduğu İrlanda'da bu oran %40 civarında seyretmektedir [9, 138–145].

Amerika Birleşik Devletleri'nde ise enterokokların 2009-2014 yılları aralığında en yaygın ikinci hastane enfeksiyonu etkeni olduğu belirlenmiştir. Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından yayınlanan sürveyans raporlarında, farklı enfeksiyon tiplerinde *E. faecalis* ve *E. faecium*'un vankomisin direnç yüzdeleri belirtilmiştir. Bu raporlara göre *E. faecium*'da vankomisin direnci kan dolaşımı ve üriner sistem enfeksiyonlarında 2007-2008 yıllarında %80 civarındayken yıllar içinde %85'e kadar yükselmiştir. *E. faecalis*'in yol açtığı kan dolaşımı ve üriner sistem enfeksiyonlarında vankomisin direnci %6-7 civarından %9'lara çıkmıştır. Bununla beraber cerrahi alan enfeksiyonlarında direnç prevalansı *E. faecium*'da %65'ten %58'e, *E. faecalis*'te ise %4,6'dan %3,5'e gerilemiştir [7, 146–148].

Glikopeptit direnç genlerinin dünyada dağılımı incelendiğinde VanA tipi direncin yıllar içinde daha da yaygınlaştığı görülmektedir. 2000 yılında 27 ülkeden 49 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada toplam 4208 klinik enterokok örneği izole edilmiş, bunların 18'inde *vanA*, 5'inde *vanB* ve 28'inde *vanC* genotipinin varlığı gösterilmiştir [149]. 2003 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nden 839 ve Avrupa'dan 56 VRE örneğinin incelendiği SENTRY sürveyans programı sonucunda, bütün VRE izolatlarının %91'inin *E. faecium*, %7,8'inin ise *E. faecalis* olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada VanA fenotipinin Kuzey Amerika'daki prevalansının (%76), Avrupa'dan (%40) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [150]. Bu çalışmada %89,72 oranında bulunan VanA prevalansı hem Avrupa, hem ABD ortalamasından daha yüksektir.

E. faecium vankomisin direncinin en sık görüldüğü enterokok suşudur. Baskın enterokok türleri arasında olan *E. faecalis*'in insanlarda görülme sıklığı giderek artmaktadır. Enterokoklarda giderek artan çoklu antimikrobiyal direnci dikkat çekmektedir. Örneğin

vankomisin dirençli bir *S. aureus* (VRSA) izolatının taşıdığı *vanA* direnç genini *E. faecalis*'ten kazandığı düşünülmektedir [151].

Vankomisin dirençli 4 adet *E. faecium*, 2 adet *E. faecalis* ve 2 adet *Enterococcus spp.* izolatlarının glikopeptit direnci (VanA fenotipi ve VanB fenotipi) ile ilgili fenotip ve genotipi PZR ile belirlenememiştir (%8,88).

Genel olarak VanA tipi, en yaygın dirençtir ve vankomisine yüksek düzeyde direnç ve genellikle teikoplanine çapraz direnç ile karakterizedir. Vankomisine dirençli teikoplanine duyarlı VanB fenotipi bu çalışmada yalnızca bir (%0,93) izolatta görülmüştür. Ülkemizde ilk VanB pozitif *E. faecium* 2012 yılında belirlenmiş olup, başka ülkelerde de vanB tipi direnç görülmüştür [152–155]. *vanA* direnç geninin yaygın olması ve hızlı artışı direnç genetik materyali transfer yeteneğinin, VanA fenotipindeki enterokoklarda artmış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Dünyada yaygın olan VanA, VanB ve VanC tipi direncin yanı sıra *E. faecalis*'te VanG tipi vankomisine düşük düzeyde direnç gözlenmiş ve 2016 yılında ilk kez vankomisin dirençli *E. faecium*'da VanG tipi direnç görülmüştür [156, 157].

E. avium ve *E. hirae* hayvanlarda enfeksiyon nedeni olmasına rağmen insan klinik örneklerinden nadir olarak izole edilmektedir [158–160]. *E. hirae* insan klinik örneklerinde %1'den az görülmesine rağmen, ciddi ve hayatı tehdit eden hastalıklarla ilişkili bakteriyemi olgularında tanımlanması nedeniyle hekimlerin şimdiye kadar az bilinen patojenin klinik önemini gözden kaçırmamaları gerektiği vurgulanmaktadır [161, 162].

Bu çalışmada yaygın VRE suşlarının yanı sıra nadir görülen *E. avium* (%2,80) ve *E. hirae* (%1,87) suşlarında VanA geni varlığı belirlenmiştir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada VRE kolonize olan bir grupta *E. avium* (%0,6) ve *E. hirae* (%0,6) izole edilmiştir [163].

VRE salgınlarında çoğunlukla iki baskın enterokok *E. faecalis* ve *E. faecium* ile birlikte nadiren *E. raffinosus* gibi diğer türlere rastlanmaktadır [164]. *E. raffinosus* ev kedilerinin orofaringeal florasından ve bazen insan klinik örneklerinden; endokardit ve kan, idrar, apse, yaralar, periton sıvısı, safra ve omurilik osteomyeliti gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmektedir [165, 166]. Araştırmamızda nefroloji servisindeki bir hasta idrarından elde edilen *E. raffinosus* izolatında *vanA* geni belirlenmiştir. PZR ile *vanA* geni varlığı

gösterilmesinin; *E. raffinosus* 'un tanımlama zorlukları nedeniyle VRE kontrol stratejilerinde gözden kaçırılma ihtimalini azaltacağı düşünülmektedir [167].

Enterococcus gallinarum ve *Enterococcus casseliflavus*'un yatan ya da ayakta tedavi gören hastaların bağırsak sisteminde kolonize olduğu ve endokardit ve bakteriyemi gibi nadir insan enfeksiyonlarına neden oldukları bilinmektedir [168, 169]. Hareketli olan bu suşlardaki *vanC* genleri (*vanC1* ve *vanC2/vanC3*) vankomisine düşük düzeyde direnç sağlamaktadır. VanC fenotipindeki enterokokların klinik ve epidemiyolojik önemini gösteren az sayıda araştırma bulunmaktadır. Ancak dünyada *vanA* ve *vanB* genlerini taşıyan vankomisine dirençli *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* klinik izolatları olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır [170, 171]. Bu çalışmada 2 adet *E. casseliflavus* ve 1 adet *E. gallinarum* izolatında *vanA* ve *vanB* direnç genleri varlığı gösterilememiştir.

VRE tespit edilen klinik örneklerin çoğunluğu çocuk hematoloji kliniği (%15,87), nefroloji kliniği (%14,02) ve genel cerrahi yoğun bakım ünitesinden (%11,21) sağlanmıştır. İç hastalıkları yoğun bakım ünitesinde *vanA* direnç geni bulunma oranı diğer kliniklere göre daha yüksektir (%7,48). Aynı hastanede iki yoğun bakım ünitesinde VanA fenotipi oranları birbirinden farklıdır. Hastanın hastanedeki lokasyonuna bakılarak dirençli patojen yüzdesi ve lokasyon arasındaki ilişkiyi destekleyecek tutarlı bulgular bulunmamaktadır [147].

Nozokomiyel patojen olan enterokoklar ABD'de ikinci sırada nozokomiyel üriner sistem enfeksiyonu etkenidirler [7]. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında idrar kültürlerinden enterokoklar sıklıkla izole edilmektedir. Araştırmamızda kullanılan klinik izolatların %34,58'ini idrardan elde edilen izolatlar oluşturmaktadır. İdrar izolatlarının %14,02'si nefroloji kliniğinden sağlanmıştır.

Vankomisin dirençli enterokoklarda direnç genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile kısa sürede belirlenmesinin, hastanın kısa sürede tedavisine başlanmasına olanak sağlayacağı gibi direncin yayılımının da minimuma indirilmesinde katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. PZR yöntemi, ağır iş yükü olan hastanelerde VRE'nin gözlemlenmesi için kültür ve fenotipik yöntemlere cazip bir alternatiftir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2011-2017 yılları arasında vankomisin dirençli enterokok (VRE) olarak tanımlanan bakteri izolatlarının vankomisin direnç tipleri PZR yöntemiyle belirlenmiştir.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında manuel, yarı otomatize veya otomatize yöntemlerle vankomisin dirençli olarak tanımlanan izolatlarda vankomisin direnç geninin doğru ve hızlı bir şekilde PZR yöntemiyle belirlenmesi, hastane enfeksiyonlarının kontrolünde ve hastane içinde yayılımının azaltılmasında alınacak önlemlerin düzenlenmesinde önemlidir.

Gazi Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen mikroorganizma sayılarının yıllara göre değişimi incelendiğinde, enterokok enfeksiyonlarının sayısındaki artışa rağmen VRE prevalansının Türkiye ve Avrupa geneline kıyasla büyük bir hızla artmadığı görülmektedir. Ancak özellikle enterokoklar gibi virülans ve direnç faktörlerini kolayca horizontal olarak aktarabilen mikroorganizmalarda, epidemiyolojik farklılıklar yalnızca coğrafi nedenlerden kaynaklanmamaktadır. Aynı ülkenin farklı bölgeleri, hatta aynı bölgenin farklı sağlık kuruluşlarında bile birbirinden oldukça farklı sonuçlarla karşılaşılabilir.

Direnç genotiplerinin dağılımı değerlendirildiğinde, Avrupa'da ortalama %40, Amerika'da ortalama %70 prevalansı olan VanA tipi direnç, çalışmamızda %88,42 gibi bir oranla oldukça yüksek bulunmuştur. VanB tipi direnç prevalansı (%0,93) beklenildiği gibi dünya genelindeki orana benzer bulunmuştur. Gerek antimikrobiyal tedavi politikalarının iyileştirilmesi, gerekse sağlık kurumunun enfeksiyon kontrol stratejilerinin değerlendirilmesi için moleküler yöntemlerle direnç analizi faydalı olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Wenzel, R. P. (2004). The Antibiotic Pipeline — Challenges, Costs, and Values. *New England Journal of Medicine*, 351(6), 523–526.
2. Talbot, G. H., Bradley, J., Edwards, J. E., Gilbert, D., Scheld, M., & Bartlett, J. G. (2006). Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 42(5), 657–668.
3. Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, (6), 25–64.
4. Arias, C. A., Contreras, G. A., & Murray, B. E. (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 555–562.
5. Werner, G. (2012). Current Trends of Emergence and Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci. *Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium*, (June 2014), 1–53.
6. O’Driscoll, T., & Crank, C. W. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, 8, 217–230.
7. Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., & Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 37(11), 1288–1301.
8. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı, & Ankara. (n.d.). *Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2013 Yıllık Raporu*. <http://uamdss.thsk.gov.tr>. Ankara.
9. European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. [www.Ecdc.Europa.Eu](http://www.ecdc.europa.eu).
10. Murray, B. E. (1990). The Life and Times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 46–65.
11. Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y., & Shankar, N. (2014). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. Boston.
12. Lancefield, R. C. (1933). A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*, 57(4), 571–95.
13. Sherman, J. M. (1937). The streptococci. *Bacteriological reviews*, 1(1), 3–97.

14. Sherman, J. M. (1938). The Enterococci and Related Streptococci. *Journal of Bacteriology*, 35(2), 81–93.
15. Schleifer, K. H., & Kilpper-Balz, R. (1984). 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*, 34(1), 31–34.
16. <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>. (2018). *Eriřim tarihi: 16.01.2018*.
17. Frolková, P., řvec, P., Sedláček, I., Mařlaňová, I., řernohlávková, J., Ghosh, A., Zurek, L., Radiměřský, T., & Literák, I. (2013). *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3069–3074.
18. řvec, P., Vancanneyt, M., Devriese, L. A., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., & Swings, J. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 2183–2187.
19. de Vaux, A., Laguerre, G., Divies, C., & Prevost, H. (1998). *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *International journal of systematic bacteriology*, 48, 383–387.
20. Collins, M. D., Jones, D., Farrow, J. A. E., Kilpper-Balz, R., & Schleifer, K. H. (1984). *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*, 34(2), 220–223.
21. Kadri, Z., Spitaels, F., Cnockaert, M., Praet, J., El Farricha, O., Swings, J., & Vandamme, P. (2015). *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 1257–1265.
22. Carvalho, M. da G. S., Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Sampson, A. J., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M., & Facklam, R. R. (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1505–1508.
23. Sukontasing, S., Tanasupawat, S., Moonmangmee, S., Lee, J. S., & Suzuki, K. I. (2007). *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2151–2154.
24. Naser, S. M., Vancanneyt, M., De Graef, E., Devriese, L. A., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., řvec, P., Decostere, A., Haesebrouck, F., & Swings, J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2177–2182.
25. De Graef, E. M., Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M., Collins, M. D., Lefebvre, K., Swings, J., & Haesebrouck, F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1069–1074.
26. Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB: List No. 31. (1989). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 495–497.
 27. Devriese, L. A., Ceysens, K., Rodrigues, U. M., & Collins, M. D. (1990). *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiology Letters*, 71(3), 247–251.
 28. Švec, P., Vancanneyt, M., Koort, J., Naser, S. M., Hoste, B., Vihavainen, E., Vandamme, P., Swings, J., & Björkroth, J. (2005). *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2479–2484.
 29. Kim, J. Y., Shin, N. R., Na, H. K., Hyun, D. W., Whon, T. W., Kim, P. S., Yun, J. H., & Bae, J. W. (2013). *Enterococcus diestrammenae* sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena coreana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4540–4545.
 30. Martinez-Murcia, A. J., & Collins, M. D. (1991). *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *Fems Microbiology Letters*, 80(1), 69–74.
 31. Cotta, M. A., Whitehead, T. R., Falsen, E., Moore, E., & Lawson, P. A. (2013). Two novel species *Enterococcus lemanii* sp. nov. and *Enterococcus eurekensis* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103, 1409–1418.
 32. Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M. C., Ingianni, A., Cortis, G., & Dainelli, B. (1992). *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *International journal of systematic bacteriology*, 42(3), 365–369.
 33. Tyrrell, G. J., Turnbull, L., Teixeira, L. M., Lefebvre, J., Carvalho, G. S., Richard, R., Lovgren, M., & Facklam, R. R. (2002). *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolate from human clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 40(4), 1140–1145.
 34. Švec, P., Devriese, L. A., Sedláček, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J., & Doškař, J. (2001). *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1567–1574.
 35. Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Sukura, A., & Björkroth, J. (2004). *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1823–1827.
 36. Farrow, J. A. E., & Collins, M. D. (1985). *Enterococcus hirae*, a New Species That Includes Amino Acid Assay Strain NCDO 1258 and Strains Causing Growth Depression in Young Chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(1), 73–75.

37. Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., & Manachini, P. L. (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1717–1721.
38. Morandi, S., Cremonesi, P., Povoledo, M., & Brasca, M. (2012). *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(8), 1992–1996.
39. Collins, M. D., Farrow, J. A. E., & Jones, D. (1986). *Enterococcus mundtii* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 36(1), 8.
40. Lucena-Padrós, H., Gonzalez, J. M., Caballero-Guerrero, B., Ruiz-Barba, J. L., & Maldonado-Barragan, A. (2014). *Enterococcus olivae* sp. nov., isolated from spanish-style green-olive fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2534–2539.
41. Law-Brown, J., & Meyers, P. R. (2003). *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 683–685.
42. Švec, P., Vandamme, P., Bryndová, H., Holochová, P., Kosina, M., Mašlaňová, I., & Sedláček, I. (2012). *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1499–1505.
43. Teixeira, L. M., Carvalho, M. G. S., Espinola, M. M. B., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Brenner, D. J., & Facklam, R. R. (2001). *Enterococcus porcinius* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1737–1743.
44. Collins, M. D., Facklam, R. R., Farrow, J. A. E., & Williamson, R. (1989). *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *Fems Microbiology Letters*, 57(3), 283–288.
45. Sistek, V., Maheux, A. F., Boissinot, M., Bernard, K. A., Cantin, P., Cleenwerck, I., de Vos, P., & Bergeron, M. G. (2012). *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(6), 1314–1320.
46. Maarit Niemi, R., Ollinkangas, T., Paulin, L., Švec, P., Vandamme, P., Karkman, A., Kosina, M., & Lindström, K. (2012). *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9), 2169–2173.
47. Sedláček, I., Holochová, P., Mašlaňová, I., Kosina, M., Spröer, C., Bryndová, H., Vandamme, P., Rudolf, I., Hubálek, Z., & Švec, P. (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART2), 502–510.
48. Rodrigues, U., & Collins, M. D. (1990). Phylogenetic analysis of *Streptococcus*

- saccharolyticus based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 71(1–2), 231–234.
49. Chen, Y. S., Lin, Y. H., Pan, S. F., Ji, S. H., Chang, Y. C., Yu, C. R., Liou, M. S., Wu, H. C., Ootoguro, M., Yanagida, F., Liao, C. C., Chiu, C. M., & Huang, B. Q. (2013). *Enterococcus saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* subsp. nov., isolated from broccoli. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 12), 4691–4697.
 50. Vancanneyt, M., Zamfir, M., Devriese, L. A., Lefebvre, K., Engelbeen, K., Vandemeulebroecke, K., Amar, M., De Vuyst, L., Haesebrouck, F., & Swings, J. (2004). *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2175–2179.
 51. Harada, T., Dang, V. C., Nguyen, D. P., Nguyen, T. A. D., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Motooka, D., Nakamura, S., Uchida, K., Jinnai, M., Yonogi, S., Kawahara, R., Kanki, M., Kawai, T., Kumeda, Y., & Yamamoto, Y. (2016). *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 3779–3785.
 52. Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C. R., & Fryer, J. L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov. a Fish Pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 406–409.
 53. Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B., & Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 577–581.
 54. Tanasupawat, S., Sukontasing, S., & Lee, J. S. (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(7), 1630–1634.
 55. Rahkila, R., Johansson, P., Säde, E., & Björkroth, J. (2011). Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1196–1203.
 56. Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Baele, M., Descheemaeker, P., Goossens, H., Pot, B., Vandamme, P., Swings, J., Haesebrouck, F., & Devriese, L. A. (2001). *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 393–400.
 57. Li, C. Y., Tian, F., Zhao, Y. D., & Gu, C. T. (2014). *Enterococcus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 3), 1012–1017.
 58. Mike Miller/ CDC. (1978). Cocci-shaped *Enterococcus* spp. bacteria taken from a pneumonia patient. *Public Health Image Library (PHIL)*.
 59. Facklam, R. R., Carvalho, M. da G. S., & Teixeira, L. M. (2002). History, taxonomy,

- biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In *The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance* (Vol. 15, pp. 1–54). American Society of Microbiology.
60. Manero, A., & Blanch, A. R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4425–4430.
 61. J.Silhavy, T., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), 1–17.
 62. Hancock, L. E., Murray, B. E., & Sillanpää, J. (2014). Enterococcal Cell Wall Components and Structures. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* (pp. 503–546). Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
 63. Scheffers, D.-J., & Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 69(4), 585–607.
 64. Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63(1), 174–229.
 65. Huycke, M. M., Spiegel, C. A., & Gilmore, M. S. (1991). Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(8), 1626–1634.
 66. Miyauchi, E., Morita, M., Rossi, M., Morita, H., Suzuki, T., & Tanabe, S. (2012). Effect of D-Alanine in Teichoic Acid from the *Streptococcus thermophilus* Cell Wall on the Barrier-Protection of Intestinal Epithelial Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(2), 283–288.
 67. Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 462–478.
 68. Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G., & Gilmore, M. S. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity*, 67(1), 193–200.
 69. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., & Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2888–2896.
 70. Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J. R., & Lasa, I. (2001). The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4538–4545.
 71. Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., Gilmore, M. S., & Shankar, N. (2004). Enterococcal Surface Protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 72(10), 6032–6039.
 72. Heikens, E., Leendertse, M., Wijnands, L. M., Van Luit-Asbroek, M., Bonten, M. J.

- M., Van Der Poll, T., & Willems, R. J. L. (2009). Enterococcal surface protein Esp is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiology*, *9*, 1–7.
73. Galli, D., Lottspeich, F., & Wirth, R. (1990). Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Molecular Microbiology*, *4*(6), 895–904.
 74. Kao, S. M., Olmsted, S. B., Viksnins, A. S., Gallo, J. C., & Dunny, G. M. (1991). Molecular and genetic analysis of a region of plasmid pCF10 containing positive control genes and structural genes encoding surface proteins involved in pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, *173*(23), 7650–64.
 75. Galli, D., Friesenegger, A., & Wirth, R. (1992). Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1 -encoded) aggregation substance. *Molecular Microbiology*, *6*(10), 1297–1308.
 76. Hendrickx, A. P. A., Willems, R. J. L., Bonten, M. J. M., & van Schaik, W. (2009). LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends in Microbiology*, *17*(9), 423–430.
 77. Olmsted, S. B., Kao, S. M., Van Putte, L. J., Gallo, J. C., & Dunny, G. M. (1991). Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10. *Journal of Bacteriology*, *173*(23), 7665–7672.
 78. Waters, C. M., & Dunny, G. M. (2001). Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *Journal of Bacteriology*, *183*(19), 5659–5667.
 79. Upadhyaya, Pmg., Ravikumar, K., & Umapathy, B. (2009). Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, *27*(4), 301.
 80. Coburn, P. S., & Gilmore, M. S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: A novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, *5*(10), 661–669.
 81. Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fiedler, S., Wirth, R., & Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. liquefaciens. *Infection and Immunity*, *59*(1), 415–420.
 82. Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2001). Characterization of fsr, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Journal of Bacteriology*, *183*(11), 3372–3382.
 83. Garsin, D. A., Frank, K. L., Silanpää, J., Ausubel, F. M., Hartke, A., Shankar, N., & Murray, B. E. (2014). *Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

84. Enne, V. I., Delsol, A. A., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2004). Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(2), 203–207.
85. Bushby, S. R. M., & Hitchings, G. H. (1968). Trimethoprim, a Sulphonamide Potentiator. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, *33*(1), 72–90.
86. Crider, S. R., & Colby, S. D. (1985). Susceptibility of enterococci to trimethoprim and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *27*(1), 71–75.
87. Zervos, M. J., & Schaberg, D. R. (1985). Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *28*(3), 446–448.
88. Grayson, M. L., Thauvin-Eliopoulos, C., Eliopoulos, G. M., Yao, J. D. C., DeAngelis, D. V., Walton, L., Woolley, J. L., & Moellering, R. C. (1990). Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *34*(9), 1792–1794.
89. Sarkar, S. K., Chowdhury, C., & Ghosh, A. S. (2010). Deletion of penicillin-binding protein 5 (PBP5) sensitises *Escherichia coli* cells to β -lactam agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *35*(3), 244–249.
90. Fontana, R., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lopez, H., Sucari, A., & Satta, G. (1994). Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *38*(9), 1980–3.
91. Sifaoui, F., Arthur, M., Rice, L., & Gutmann, L. (2001). Role of penicillin-binding protein 5 in expression of ampicillin resistance and peptidoglycan structure in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(9), 2594–2597.
92. Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* (pp. 1–63). Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
93. Comenge, Y., Quintiliani, R., Li, L., Dubost, L., Brouard, J. P., Hugonnet, J. E., & Arthur, M. (2003). The CroRS Two-Component Regulatory System Is Required for Intrinsic β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, *185*(24), 7184–7192.
94. Hancock, L. E., & Perego, M. (2004). Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of Bacteriology*, *186*(23), 7951–7958.
95. Rice, L. B. (2005, December 15). Antibiotics and gastrointestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Springer-Verlag.
96. Manson, J. M., Hancock, L. E., & Gilmore, M. S. (2010). Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial

- resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12269–12274.
97. Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A. V., Bergeron, J., & Retsema, J. A. (1996). Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Molecular microbiology*, 22(5), 867–879.
 98. Singh, K. V., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2002). An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (*Lsa*) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1845–50.
 99. Marshall, S. H., Donskey, C. J., Hutton-Thomas, R., Salata, R. A., & Rice, L. B. (2002). Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3334–3336.
 100. Liu, Y., Wang, Y., Wu, C., Shen, Z., Schwarz, S., Du, X. D., Dai, L., Zhang, W., Zhang, Q., & Shen, J. (2012). First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1650–1654.
 101. Aslangul, E., Massias, L., Meulemans, A., Chau, F., Andremont, A., Courvalin, P., Fantin, B., & Ruimy, R. (2006). Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3615–3621.
 102. Costa, Y., Galimand, M., Leclercq, R., Duval, J., & Courvalin, P. (1993). Characterization of the chromosomal *aac(6′)-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1896–1903.
 103. Galimand, M., Schmitt, E., Panvert, M., Desmolaize, B., Douthwaite, S., Mechulam, Y., & Courvalin, P. (2011). Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA*, 17(2), 251–262.
 104. Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X., & Murray, B. E. (2012). Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *enterococcus faecium*. *PLoS ONE*, 7(1), e30187.
 105. Steenbergen, J. N., Alder, J., Thorne, G. M., & Tally, F. P. (2005). Daptomycin: A lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 283–288.
 106. Kelesidis, T., Humphries, R., Uslan, D. Z., & Pegues, D. A. (2011). Daptomycin nonsusceptible enterococci: An emerging challenge for clinicians. *Clinical Infectious Diseases*, 52(2), 228–234.
 107. Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 632–639.

108. Palmer, K. L., Daniel, A., Hardy, C., Silverman, J., & Gilmore, M. S. (2011). Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3345–3356.
109. López, M., Tenorio, C., Del Campo, R., Zarazaga, M., & Torres, C. (2011). Characterization of the Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci of Different Origins. *Journal of Chemotherapy*, 23(2), 87–91.
110. Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., Arakawa, S., Kawabata, M., & Fujisawa, M. (2011). Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3912–3916.
111. Oyamada, Y., Ito, H., Inoue, M., & Yamagishi, J. I. (2006). Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(10), 1395–1401.
112. Werner, G., Fleige, C., Ewert, B., Laverde-Gomez, J. A., Klare, I., & Witte, W. (2010). High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(2), 119–125.
113. Arthur, M., & Courvalin, P. (1993). Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(8), 1563–71.
114. Baptista, M., Depardieu, F., Reynolds, P., Courvalin, P., & Arthur, M. (1997). Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci. *Molecular Microbiology*, 25(1), 93–105.
115. Arias, C. a, Martín-Martinez, M., Blundell, T. L., Arthur, M., Courvalin, P., & Reynolds, P. E. (1999). Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular microbiology*, 31(6), 1653–64.
116. Perio, M. A. de, Yarnold, P. R., Warren, J., & Noskin, G. A. (2006). Risk Factors and Outcomes Associated With Non-*Enterococcus faecalis*, Non-*Enterococcus faecium* Enterococcal Bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 27(1), 28–33.
117. Murdoch, D. R., Corey, R. G., Hoen, B., Miró, M., Fowler, V. G., Bayer, A. S., Karchmer, A. W., Olaison, L., Pappas, P. A., Moreillon, P., Chambers, S. T., Chu, V. H., Falcó, V., Holland, D. J., Jones, P., Klein, J. L., Raymond, N. J., Read, K. M., Tripodi, M. F., Utili, R., Wang, A., Woods, C. W., & Cabell, C. H. (2009). Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century The international collaboration on Endocarditis-prospective cohort study. *Archives of Internal Medicine*, 169(5), 463–473.
118. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2011). *Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu 2011*.
119. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2012). *Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu 2012*.

120. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2013). *Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu 2013*.
121. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2014). *Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu 2014*.
122. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2015). *Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu 2015*.
123. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2016). *Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı Özet Raporu 2016*.
124. Uttley, A. C., Collins, C. H., Naidoo, J., & George, R. C. (1988). VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI. *The Lancet*, 331(8575–8576), 57–58.
125. Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., & Courvalin, P. (1988). Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. *New England Journal of Medicine*, 319(3), 157–161.
126. Sahm, D. F., Kissinger, J., Gilmore, M. S., Murray, P. R., Mulder, R., Solliday, J., & Clarke, B. (1989). In Vitro Susceptibility Studies of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(9), 1588–1591.
127. Akpaka, P. E., Kissoon, S., & Jayaratne, P. (2016). Molecular Analysis of Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Regional Hospitals in Trinidad and Tobago. *Advances in Medicine*, 2016, 1–8.
128. Vural, T., Şekercioğlu, A. O., Ögünç, D., Gültekin, M., Çolak, D., Yeşilipek, A., Ünal, S., Kocagöz, S., & Mutlu, G. (1999). Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *ANKEM Dergisi*, 13(1), 1–4.
129. Başustaoğlu, A., Özyurt, M., Beyan, C., Altun, B., Aydoğan, H., Haznedaroğlu, T., Ünal, S., & Yalçın, A. (2000). Glikopeptid Dirençli *Enterococcus faecium*. *Flora*, 5(2), 142–147.
130. Ağuş, N., Sarıca, A., Özkalay, N., & Cengiz, A. (2006). Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotik Direnci. *ANKEM Dergisi*, 20(3), 145–147.
131. Aral, M., Paköz, N. İ. E., Aral, İ., & Doğan, S. (2011). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* suşlarının antibiyotik direnci. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(2), 85–92.
132. Ozseven, A. G., Sesli Cetin, E., Cicioglu Aridogan, B., Ciftci, E., & Ozseven, L. (2011). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 25(4), 256–262.
133. Aktepe, O. C., Aşık, G., Çiftçi, İ. H., & Çetinkaya, Z. (2011). Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41(2), 86–90.
134. Kalayci, O., Gul Yurtsever, S., Gungor, S., Uzun, B., & Kurultay, N. (2011). İdrar Örneklerinden İzole Edilen Enterokokların in vitro Antibiyotik Direnç Oranlarının

- Belirenmesi. *Klimik Dergisi/Klimik Journal*, 24(2), 105–107.
135. Çaylan, R., Üstünakin, M., Kadimov, V., Aydın, K., & Köksal, İ. (2004). Fekal ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34, 24–28.
 136. Gozalan, A., Coskun-Ari, F. F., Ozdem, B., Unaldi, O., Celikbilek, N., Kirca, F., Aydogan, S., Muderris, T., Guven, T., Acikgoz, Z. C., & Durmaz, R. (2015). Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 759–766.
 137. Cekin, Y., Daloğlu, A. E., Ögünç, D., Özhak Baysan, B., Dağlar, D., İnan, D., Mutlu, D., Öngüt, G., & Çolak, D. (2013). Evaluation of Vancomycin Resistance 3 Multiplexed PCR Assay for Detection of Vancomycin-Resistant Enterococci from Rectal Swabs. *Annals of Laboratory Medicine*, 33(5), 326–330.
 138. European Centre for Disease Prevention and Control. (2009). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 139. European Centre for Disease Prevention and Control. (2010). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 140. European Centre for Disease Prevention and Control. (2011). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 141. European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 142. European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 143. European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 144. European Centre for Disease Prevention and Control. (2015). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Elsevier Inc.
 145. European Centre for Disease Prevention and Control. (2016). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*.
 146. Solomon, S., Horan, T., Andrus, M., Edwards, J., Emori, G., Fridkin, S., Peavy, G., Tolson, J., Upadhyayula, S., & Yi, B. (2002). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 to June 2002,

- issued August 2002. *American Journal of Infection Control*, 30(8), 458–475.
147. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., & Fridkin, S. K. (2008). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(11), 996–1011.
 148. Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., Limbago, B., & Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1–14.
 149. Schouten, M. A., Hoogkamp-Korstanje, J. A. A., Meis, J. F. G., & Voss, A. (2000). Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19, 816–822.
 150. Deshpande, L. M., Fritsche, T. R., Moet, G. J., Biedenbach, D. J., & Jones, R. N. (2007). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58(2), 163–170.
 151. Flannagan, S. E., Chow, J. W., Donabedian, S. M., Brown, W. J., Perri, M. B., Zervos, M. J., Ozawa, Y., & Clewell, D. B. (2003). Plasmid Content of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolate from a Patient Also Colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA Phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3954–3959.
 152. Coşkun, F. A., Mumcuoğlu, I., Aksu, N., Karahan, Z. C., Us, E., Tekeli, F. A., Baran, I., Kanyılmaz, D., & Kurşun, S. (2012). Bir Devlet Hastanesinde Vankomisine Dirençli Enterokok Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Olarak Değerlendirilmesi: İlk vanB-Pozitif *Enterococcus faecium* İzolatları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(2), 276–282.
 153. Sun, H., Wang, H., Xu, Y., Jones, R. N., Costello, A. J., Liu, Y., Li, G., Chen, M., & Mendes, R. E. (2012). Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(4), 399–403.
 154. López, M., Cercenado, E., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2012). Diversity of Clones and Genotypes Among Vancomycin-Resistant Clinical *Enterococcus* Isolates Recovered in a Spanish Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 18(5), 484–491.
 155. Kawalec, M., Gniadkowski, M., Zaleska, M., Ozorowski, T., Konopka, L., & Hryniewicz, W. (2001). Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: Probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1781–1787.

156. Boyd, D. A., Du, T., Hizon, R., Kaplen, B., Murphy, T., Tyler, S., Brown, S., Jamieson, F., Weiss, K., & Mulvey, M. R. (2006). VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains isolated in Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(6), 2217–2221.
157. Sassi, M., Guérin, F., Leseq, L., Isnard, C., Fines-Guyon, M., Cattoir, V., & Giard, J.-C. (2018). Genetic characterization of a VanG-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (January), 1–4.
158. Bourafa, N., Loucif, L., Boutefnouchet, N., & Rolain, J. M. (2015). *Enterococcus hirae*, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: First case report in Algeria. *New Microbes and New Infections*, *8*, 7–9.
159. Salem-Bekhit, M. M., Moussa, I. M. I., Muharram, M. M., Alanazy, F. K., & Hefni, H. M. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of multidrug-resistant enterococci isolated from clinical specimens. *Indian journal of medical microbiology*, *30*(1), 44–51.
160. Zouain, M. G., & Araj, G. F. (2001). Antimicrobial resistance of Enterococci in Lebanon. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *17*(3), 209–213.
161. Dicipinigaitis, P. V., De Aguirre, M., & Divito, J. (2015). *Enterococcus hirae* Bacteremia Associated with Acute Pancreatitis and Septic Shock. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2015*, 1–3.
162. Pãosinho, A., Azevedo, T., Alves, J. V., Costa, I. A., Carvalho, G., Peres, S. R., Baptista, T., Borges, F., & Mansinho, K. (2016). Acute Pyelonephritis with Bacteremia Caused by *Enterococcus hirae*: A Rare Infection in Humans. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2016*, 1–3.
163. Ozkaya-Parlakay, A., Cengiz, A. B., Ceyhan, M., Bagdat, A., Barin-Kurtoglu, C., Gurbuz, V., Ayçan, A. E., & Kara, A. (2014). Vancomycin-resistant enterococcus colonization and infection in children: six-year follow-up. *Turkish Journal of Pediatrics*, *56*(6), 618–625.
164. Samuel, J., Coutinho, H., Galloway, A., Rennison, C., Kaufmann, M. E., & Woodford, N. (2008). Glycopeptide-resistant *Enterococcus raffinosus* in a haematology unit: an unusual cause of a nosocomial outbreak. *The Journal of hospital infection*, *70*(3), 294–6.
165. Sandoe, J. A., Witherden, I. R., & Settle, C. (2001). Vertebral osteomyelitis caused by *Enterococcus raffinosus*. *Journal of clinical microbiology*, *39*(4), 1678–9.
166. Freyaldenhoven, B. S., Schlieper, G., Lütticken, R., & Reinert, R. R. (2005). *Enterococcus raffinosus* infection in an immunosuppressed patient: case report and review of the literature. *Journal of Infection*, *51*(3), e121–e124.
167. Kawalec, M., Kędzierska, J., Gajda, A., Sadowy, E., Węgrzyn, J., Naser, S., Skotnicki, A. B., Gniadkowski, M., & Hryniewicz, W. (2007). Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus*

- and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(9), 893–901.
168. Reid, K. C., Cockerill, F. R., & Patel, R. (2001). Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(11), 1540–6.
 169. Dargere, S., Vergnaud, M., Verdon, R., Saloux, E., Le Page, O., Leclercq, R., & Bazin, C. (2002). *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2308–10.
 170. Corso, A., Faccone, D., Gagetti, P., Togneri, A., Lopardo, H., Melano, R., Rodríguez, V., Rodríguez, M., & Galas, M. (2005). First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(1), 51–56.
 171. Camargo, I. L. B. C., Barth, A. L., Pilger, K., Seligman, B. G. S., Machado, A. R. L., & Darini, A. L. C. (2004). *Enterococcus gallinarum* carrying the vanA gene cluster: first report in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(11), 1669–1671.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : KUTLUK, İsmet
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri : 04.05.1989, KONYA
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (312) 202 3198
E-Posta : ikutluk@gazi.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Alanya A.M.E. Anadolu Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017-	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2016-2017	Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce YDS 2015-1: 90,00
ÜDS 2012-2: 93,75

Hobiler

Perküsyon, serbest dalış, yamaç paraşütü, tüplü dalış, tango, elektronik tasarımı, ahşap işçiliği



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

