



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**Kandan İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları
ve Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Karşılaştırılması: Üç Merkezli
Çalışma**

UZMANLIK TEZİ

Araştırma Görevlisi Doktor Salih DANYILDIZ

Ankara, 2025



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**Kandan İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları
ve Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Karşılaştırılması: Üç Merkezli
Çalışma**

UZMANLIK TEZİ

Araştırma Görevlisi Doktor Salih DANYILDIZ

Tez Danışmanı: Doçent Doktor Hasan Cenk MİRZA

Ankara, 2025

**Tez çalışması Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma
Kurulu tarafından DA24/02 proje numarasıyla onaylanmış ve Başkent
Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan büyük gurur ve memnuniyet duyduğum hem manevi hem bilimsel desteğini hep hissettiğim, birikimlerinden ve deneyimlerinden birçok kez istifade ettiğim, uzmanlık yolculuğum boyunca iyi bir araştırmacı ve bilim adamı olmam hususunda tüm gayretini sunan pek kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Hasan Cenk MİRZA 'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca engin tecrübeleri ve bilgi birikimi vasıtasıyla bana örnek teşkil eden, çalışma yıllarımı birlikte geçirme fırsatı bulmaktan zevk aldığım ve onur duyduğum pek kıymetli Anabilim Dalı başkanım Prof. Dr. Ayşe Hande ARSLAN'a ve eski Anabilim Dalı başkanım Prof. Dr. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU'na teşekkür ederim.

Başkent Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım Doç. Dr. Aylin ÜSKÜDAR GÜÇLÜ'ye ve Doç. Dr. Aylin ALTAY KOÇAK'a gerek teorik bilgim ve uygulamalı eğitimlerim sırasında bana kattıkları deneyimler açısından, gerekse akademik gelişimim açısından ellerinden geleni tereddütsüz yaptıkları için teşekkürü borç bilirim.

Rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden çokça faydalandığım Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Özlem KURT AZAP'a, tezimde kullandığım suşların teminindeki katkılarından ötürü Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Özlem ÖĞÜÇ ŞANLI'ya ve Ankara Etlik Şehir Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Elvan HORTAÇ İŞTAR'a teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca laboratuvarında hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım Sezin ÜNLÜ'ye, Gizem İNCE CEVİZ'e, Nisanur AYAS'a, Tara Emami NAMİN'e ve Osman Ege KARAGÜLLE'ye teşekkür ederim. İstatistiksel analizler konusundaki desteği nedeniyle Ayşe Yavuz DERMAN'a teşekkürü de borç bilirim.

Tüm hayatımda ellerini üstümde hissettiğim, her başarımın arkasında ki maddi manevi en büyük destekçim olan, oğlu olmaktan her daim gurur duyduğum canım annem Fidan DANYILDIZ'a, kıymetli babam Yavuz DANYILDIZ'a ve canım kardeşim Tuğba İÇAL'a çok teşekkür ederim.

ÖZET

DANYILDIZ S. Kandan İzole Edilen Enterokok Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları ve Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Karşılaştırılması: Üç Merkezli Çalışma. Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Programı, Ankara, 2025.

Enterokoklar enfektif endokardit ve kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları gibi mortal enfeksiyonlarda önemli patojenlerdir. Bu enfeksiyonların tedavisinde, sinerji koşullarının sağlanması halinde, beta-laktam/glikopeptit ve aminoglikozit kombinasyonu önemli bir tedavi seçeneğidir. Çalışmamızda kan kültürlerinden elde edilen, 3 farklı merkezden toplam 90 enterokok izolatu (45 *Enterococcus faecalis* ve 45 *Enterococcus faecium*) çeşitli demografik özellikler, kan kültürü sinyal pozitifleşme süreleri, antibiyotik duyarlılık profilleri ve bazı antibiyotik direnç genleri, biyofilm oluşturma kabiliyetleri ve biyofilm oluşumu-antibiyotik direnç ilişkisi açısından değerlendirilmiştir. Demografik açıdan *E. faecalis* izolatları kadın hastalara kıyasla erkek hastalardan anlamlı şekilde daha fazla izole edilmiştir. İzolatların %27,8'i cerrahi bölümlerdeki hastalardan %72,2'si dahili bölümlerdeki hastalardan elde edilmiştir. Dahili branşlardan onkoloji (%16,7) ve nefroloji (%13,3) başı çeken branşlar iken cerrahi branşlardan en sık kardiyovasküler cerrahi (%11,1) ve genel cerrahi (%8,9) branşlarından gelen izolatlarla rastlanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık profilleri değerlendirildiğinde *E. faecalis* izolatlarında glikopeptit direncine rastlanmazken *E. faecium* izolatlarının %31,1'inde glikopeptit direnci gözlenmiştir. Yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnç oranları *E. faecalis* için sırasıyla %24,4 ve %26,7 iken *E. faecium* için sırasıyla %66,7 ve %77,8'dir. Özellikle yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnç oranları açısından merkezler arasında da önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar beta-laktam/glikopeptit-aminoglikozit sinerjisi açısından tedavi rejimi seçimlerini etkileyebilecek olmasından ötürü önemlidir. Araştırılan direnç genleri açısından ise belirgin bir homojenite gözlenmiştir. Fenotipik glikopeptit direnci gösteren izolatların tümünde *vanA* geni izlenirken, fenotipik yüksek düzey gentamisin direnci gösteren izolatların %92,7'sinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* genine ve fenotipik yüksek düzey streptomisin direnci gösteren izolatların ise %95,6'sında *ant(6')-Ia* genine rastlanmıştır. Bu bulgu bakteriyemi etkeni enterokoklarda yüksek düzey gentamisin direncinden çoğunlukla

aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia; yüksek düzey streptomisin direncinden ise çoğunlukla *ant(6')-Ia* geninin sorumlu olduğunu düşündürmüştür. Biyofilm oluşturma oranları açısından *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatları arasında anlamlı farklılık (sırasıyla %100 ve %55,6) gözlenmiştir. Bu farklılık biyofilm oluşumunun gücünde de gözlenmiş ve *E. faecalis* izolatlarının %35,6'sı güçlü biyofilm oluştururken *E. faecium* izolatlarında güçlü biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Biyofilm oluşumunun çeşitli yollarla antimikrobiyal dirence yol açabileceği bilinmektedir. Çalışmamızda güçlü biyofilm oluşturan *E. faecalis* izolatları arasındaki YDGD oranı (%50), orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatlar arasındaki YDGD oranından (%10) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Biyofilm oluşturan ve oluşturmayan izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte, kinupristin-dalfopristin duyarlılıkları (biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmayan *E. faecium* izolatları için sırasıyla %52 ve %80) arasındaki fark istatistiksel anlamlılık sınırına yakın bulunmuştur ($p=0.051$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte siprofloksasin, kinupristin-dalfopristin ve yüksek düzey gentamisin direnç oranları orta güçte biyofilm oluşturan *E. faecium* izolatlarında, zayıf veya hiç oluşturmayan *E. faecium* izolatlarına kıyasla daha yüksek görülmüştür. Enterokoklarda özellikle *E. faecalis*'te feromon aracılı konjugasyonun özel ve önemli bir gen aktarımı mekanizması olduğu, biyofilm oluşumunun ise bu mekanizmanın gelişme ihtimalini artırdığı düşünülmektedir. Nitekim literatürde bu yolla gen aktarımı yapan plazmitlerde tetrasiklin, vankomisin ve yüksek düzey gentamisin direnç genlerinin taşınabildiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçları bazı izolatların bu mekanizma aracılığı ile -ve belki de bu plazmitler aracılı- bazı antibiyotiklere karşı direnç kazanmış olabileceğini düşündürmektedir. Eravasiklin; linezolid ve vankomisin dirençliler de dahil olmak üzere enterokoklar üzerine oldukça etkili, yeni geliştirilmiş florosiklin türevi antimikrobiyaldir. Global bir çalışmada enterokoklarda eravasiklin direnci sırasıyla *E. faecalis* ve *E. faecium* için %0,6 ve %2,3 olarak gözlenmiştir. Ülkemiz literatüründe bildirilmiş eravasiklin dirençli enterokok izolatı bulunmuyor oluşu ve bizim çalışmamızda 2 adet *E. faecium* izolatında bu duruma rastlamış olmamız önemlidir. Bu durum bu konuda çok merkezli araştırmaların yapılmasının ve direnç mekanizmalarının araştırılmasının önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Antibiyotik Direnci, İn-vitro sinerji, Biyofilm Formasyonu

Bu alışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA24/02) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.



ABSTRACT

DANYILDIZ S. Comparison of Antimicrobial Susceptibilities and Biofilm Forming Abilities of *Enterococcus* Strains Isolated from Blood: Three Center Study. Baskent University, Faculty of Medicine, Medical Microbiology Speciality Program, Ankara, 2025.

Enterococci are important pathogens that can cause fatal infections such as infective endocarditis and catheter-related bloodstream infections. The combination of beta-lactam/glycopeptide and aminoglycoside is an important treatment option for these infections if synergistic interaction is predicted. A total of 90 enterococcal isolates (45 *Enterococcus faecalis* and 45 *Enterococcus faecium*) from 3 different centers obtained from blood culture were evaluated in terms of various demographic characteristics of patients, time to positivity of blood cultures, antibiotic susceptibility profiles, some antibiotic resistance genes, biofilm-forming abilities and the association between biofilm formation and antibiotic resistance. In terms of demographics, *E. faecalis* isolates were obtained significantly more frequently from males, when compared to females. 27.8% of the isolates were obtained from patients at surgical wards and 72.2% were obtained from patients at medical wards. While oncology (16.7%) and nephrology (13.3%) were the most common departments at medical wards, cardiovascular surgery (11.1%) and general surgery (8.9%) were the most common surgical wards. Regarding the antibiotic susceptibility profiles, no glycopeptide resistance was observed in *E. faecalis* isolates, while glycopeptide resistance was observed in 31.1% of *E. faecium* isolates. High-level gentamicin and streptomycin resistance rates among *E. faecalis* isolates were 24.4% and 26.7% respectively. These rates were 66.7% and 77.8% among *E. faecium* isolates. Significant differences were also observed between centers, especially in terms of high-level gentamicin and streptomycin resistance rates. These differences are important in terms of synergy between beta-lactam/glycopeptide and aminoglycoside, which may affect treatment regimen choices. In terms of the investigated resistance genes, a significant homogeneity has been observed. The *vanA* gene was observed in all of the isolates showing phenotypic glycopeptide resistance. The *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* gene was found in 92.7% of the isolates showing phenotypic high-level gentamicin resistance and the *ant(6')-Ia* gene was found in 95.6% of the isolates showing phenotypic high level streptomycin resistance. These findings suggest that mainly *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* gene is responsible for high-level gentamicin resistance and *ant(6')-Ia* gene is responsible for high-level streptomycin resistance in enterococci causing

bacteremia. Significant differences were observed between *E. faecalis* and *E. faecium* isolates in terms of biofilm formation rates (100% and 55.6%, respectively). This difference was also observed regarding the strength of biofilm formation. While 35.6% of *E. faecalis* isolates were classified as strong biofilm producers, none of the *E. faecium* isolates produced strong biofilms. It is known that biofilm formation can lead to antimicrobial resistance in various ways. In our study, high-level gentamicin resistance rate among strong biofilm producing *E. faecalis* isolates (50%) was statistically higher than that among moderate biofilm producing *E. faecalis* isolates (10%). The differences between antibiotic susceptibilities of biofilm producing and non-biofilm producing *E. faecium* isolates were not statistically significant. However, the difference between quinupristin-dalfopristin susceptibilities approached the threshold of significance (52% and 80% for biofilm producing and non-biofilm producing *E. faecium* isolates, respectively) ($p=0.051$). For *E. faecium*, although not statistically significant, ciprofloxacin, quinupristin/dalfopristin, and high-level gentamicin resistance rates were higher in isolates that formed moderate biofilms compared to those that formed weak or no biofilms. It is thought that pheromone-mediated conjugation is a special and important gene transfer mechanism in enterococci, especially in *E. faecalis*, and biofilm formation increases the possibility of the development of this mechanism. In the literature, it has been indicated that plasmids that transfer genes in this way can carry tetracycline, vancomycin and high-level gentamicin resistance genes. The results of our study suggest that some *Enterococcus* isolates may have acquired resistance through this mechanism—and perhaps through these plasmids—against some antibiotics. Eravacycline is a newly developed fluorocycline derivative antimicrobial that is highly effective against enterococci, including those resistant to linezolid and vancomycin. In a global study, eravacycline resistance in enterococci was observed to be 0.6% and 2.3% for *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. It is important that there are no reported eravacycline resistant *Enterococcus* isolates in the literature of our country and we encountered two eravacycline-resistant *E. faecium* isolates in our study. This situation shows the importance of conducting multi-center research on this subject and investigating resistance mechanisms.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, Antimicrobial Resistance, In-vitro synergy, Biofilm Formation

This study was approved by Baskent University Institutional Review Board (Project no: DA24/02) and supported by Baskent University Research Fund.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Enterococcus faecalis</i> ve <i>Enterococcus faecium</i>	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Patogenez.....	4
2.1.3. Klinik Hastalıklar.....	7
2.1.4. Laboratuvar Tanısı.....	8
2.2. Enterokok Kaynaklı Enfeksiyonlarda Tedavi ve Antibiyotiklere Direnç.....	10
2.2.1. Antibiyotik Direncinden Sorumlu Mekanizmalar.....	12
2.2.2. <i>Enterococcus</i> Türlerinde İntrensek Direnç.....	15
2.2.3. <i>Enterococcus</i> Türlerinde Yüksek Düzey Aminoglikozit Direnci.....	16
2.2.3.1. Aminoglikozit Grubu Antibiyotiklerin Genel Özellikleri.....	17
2.2.3.2. Dirençte Rol Oynayan Mekanizmalar.....	19
2.2.3.3. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklerle Sinerji.....	21
2.2.4. <i>Enterococcus</i> Türlerinde Glikopeptit Direnci.....	22
2.2.4.1. Glikopeptit Grubu Antibiyotiklerin Genel Özellikleri.....	23
2.2.4.2. Dirençte Rol Oynayan Mekanizmalar.....	24

2.2.4.3. Enterokoklarda Vankomisin Direncinin Taranması ve Sürveyans.	26
2.3. <i>Enterococcus</i> Türlerinde Biyofilm Oluşumu.....	28
2.3.1. Biyofilm Formasyonunun Enfeksiyonlardaki Önemi.....	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
3.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler.....	35
3.1.1. Gereçler.....	35
3.1.2. Besiyerleri, Kimyasallar ve Kitler.....	36
3.2. İzolat Tanımlaması.....	37
3.2.1. Gram Boyama ve Koloni Morfolojisi	38
3.2.2. Katalaz Testi.....	38
3.2.3. Koyun Kanlı ve Safra-Eskülin Besiyerinde Üreme Özellikleri.....	38
3.2.4. L-Pirolidonil- β Naftilamid (PYR) Testi ve Uygulanışı.....	39
3.2.5. Tanımlanan İzolatların MALDI-TOF MS ile Doğrulanması.....	40
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	40
3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Duyarlılık Belirleme.....	41
3.3.2. Gradyent Difüzyon Yöntemi ile Duyarlılık Belirleme.....	42
3.4. Moleküler Yöntemlerle Direnç Genlerinin Değerlendirilmesi.....	44
3.4.1. DNA İzolasyonu.....	44
3.4.2. PZR Reaksiyon Miksi Hazırlanması.....	45
3.4.3. Amplifikasyon.....	47
3.4.4. PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Analizi.....	48
3.5. Biyofilm.....	49
3.5.1. Biyofilm Oluşturma Protokolü.....	49
3.5.2. Biyofilm Formasyonunun Değerlendirilmesi.....	50
3.6. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR.....	52
4.1. İzolatların Epidemiyolojik Özellikleri.....	52

4.1.1. Ortalama Kan Kültürü Sinyal Pozitifliği Süreleri.....	54
4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları.....	55
4.3. Antibiyotik Direnç Genleri.....	63
4.3.1. Direnç Genleri Dağılımı.....	63
4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Profilleri	66
4.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Profili ve Biyofilm Oluşumu İlişkisi.....	68
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	85
7. KAYNAKLAR	87
8. EKLER.....	105
8.1. Turnitin Uygulamasından Alınan Benzerlik İndeksi Raporu.....	105

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Enterokokların virölans faktörleri.....	6
Tablo 2. Enterokok tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları...15	
Tablo 3. Enterokokların biyofilm oluşumunda rol alan moleküller ve görevleri.....32	
Tablo 4. Disk difüzyon yöntemiyle duyarlılık sınır değerleri.....42	
Tablo 5. Yüksek doz gentamisin, yüksek doz streptomisin ve eravasiklin MİK sınır... 44 değerleri	
Tablo 6. Primer dizileri ve hedef ampikon boyutları.....	46
Tablo 7. HS Prime Taq Premix İçeriği (2X).....	47
Tablo 8. Merkezlere göre ortalama yaş ve yaş aralığı verileri.....	52
Tablo 9. İzolatların elde edildiği klinikler.....	53
Tablo 10. Kan kültürü sinyal pozitifliği süreleri.....	55
Tablo 11. Tüm izolatların antibiyotik duyarlılık oranları.....	56
Tablo 12. Merkezlere göre <i>E. faecium</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık oranları.....	60
Tablo 13. Merkezlere göre <i>E. faecalis</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık oranları.....	61
Tablo 14. Vankomisine dirençli <i>E. faecium</i> izolatları ile vankomisine duyarlı <i>E. faecium</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık kıyaslaması.....	62
Tablo 14. Merkez bazında, görülmesi beklenen sinerjistik etkileşim oranları.....	63
Tablo 15. Merkezlere göre direnç geni dağılımları.....	66
Tablo 16. Tür bazında biyofilm formasyonu-antimikrobiyal duyarlılık ilişkisi.....	69
Tablo 17. <i>E. faecium</i> için biyofilm formasyonu-antibiyotik duyarlılık ilişkisi.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. Vankomisin ve teikoplanin dirençli bir <i>E. faecium</i> izolatının antibiyotik duyarlılık testi plakları	57
Şekil 2. Üç farklı yüksek düzey aminoglikozit direnç paterninin gözlemlendiği antibiyotik duyarlılık testi plakları.....	57
Şekil 3. Eravasiklin dirençli, (EUCAST'e göre) tetrasiklin duyarlı (CLSI'a göre) izolatın antibiyotik duyarlılık testi plakları.....	58
Şekil 4. Hem eravasiklin (EUCAST'e göre) hem de tetrasikline (CLSI'a göre) dirençli izolatın antibiyotik duyarlılık testi plakları.....	59
Şekil 5. Glikopeptid direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması.....	64
Şekil 6. Yüksek düzey gentamisin direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması.....	65
Şekil 7. Yüksek düzey streptomisin direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması.....	66
Şekil 8. Biyofilm oluşumunun boyalı plak görünümü.....	67
Şekil 9. Merkezlere ve türlere göre kantitatif biyofilm oluşumu.....	68

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AAC	Aminoglikozit Asetil Transferaz
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Agg	Kümelenme Maddesi Proteinleri
AME	Aminoglikozit Modifiye Edici Enzim
AMP	Adenozin Mono Fosfat
ANT	Aminoglikozit Nükleotidil Transferaz
APH	Aminoglikozit Fosfotransferaz
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BHİ	Brain Heart İnfüzyon
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAESAR	Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CDC	Centers for Diseases Control and Prevention
CHCA	Alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cm	Santimetre
ÇİD	Çoklu İlaça Dirençli
Dk	Dakika
DNA	Deoksi ribonükleik asit
DOS	Deoksistreptamin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
Ebp	Endokardit ve biyofilm ilişkili pilus
eDNA	Çevresel Deoksi ribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik asit
EE	Enfektif Endokardit
EMB	Eozin Metilen Blue
Esp	Ekstraselüler yüzey proteini
EtBr	Etidyum Bromür

EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FK/FD	Farmakokinetik/Farmakodinamik
GeE	Jelatinaz
GİS	Gastrointestinal Sistem
GÜS	Genitoüriner Sistem
HDPM	Hücre Dışı Polisakkarit Matriks
HICPAC	Hastane Enfeksiyon Kontrol Uygulamaları Danışma Kurulu
hVISA	Heterojen Olarak Vankomisine Orta Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
İV	Damar içi
İM	Kas içi
KOB	Koloni Oluşturan Birim
LTA	Lipoteikoik Asit
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
Mg	Miligram
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MHC	Majör Doku Uygunluk Kompleksi
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
MLS _B	Makrolit-Linkozamit-Streptogramin _B
Mm	Milimetre
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NK	Negatif Kontrol
OY	Optik Yoğunluk
PAE	Post Antibiyotik Etki
PBS	Fosfat Tampunlu Tuz Çözeltisi
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PİH	Pelvik İnflamatuvar Hastalık
PilA	Pilus A
PilB	Pilus B

PYR	Pirolidonil Arilamidaz
PK	Pozitif Kontrol
Pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RND	Resistance Nodulation Division
Rpm	Revolutions per minute
SF	Serum Fizyolojik
SOD	Süperoksit Dismutaz
SprE	Serin Proteaz
TBE	Tris-Borik Asit- EDTA
TGD	Tüm Genom Dizileme
TLR	Toll Benzeri Reseptör
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultra Viyole
ÜSE	Üriner Sistem Enfeksiyonu
VRE	Vankomisine Dirençli Enterokok
VRSA	Vankomisine Dirençli <i>S. aureus</i>
YDAD	Yüksek Düzey Aminoglikozit Direnci
YDG	Yüksek Düzey Gentamisin
YDS	Yüksek Düzey Streptomisin
YDGD	Yüksek Düzey Gentamisin Direnci
YDSD	Yüksek Düzey Streptomisin Direnci
µL	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Taksonomik açıdan *Enterococcaceae* ailesinin üyesi olan *Enterococcus* cinsi bakteriler yabancı cisim mevcudiyeti veya immünosüpresyon varlığında önemli sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon etkenlerinden olduğu gibi aynı zamanda insan ve hayvan mikrobiyotasının (özellikle de gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistem florası) normal üyeleri olan bakterilerdendir. *Enterococcus* cinsi mikroorganizmaların kan dolaşımı enfeksiyonları, enfektif endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlar ile cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ve *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) insanlardan izole edilen en yaygın türler olup klinik izolatların %90'ından fazlasını oluştururlar (1).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), *E. faecium*'u antibakteriyel ilaçlara dirençli ESKAPE patojenleri (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) arasında göstermektedir (2). *Enterococcus* cinsinin küresel düzeyde probleme yol açan üç farklı önemi mevcuttur. Bunlar sebep oldukları enfeksiyonlarda görülen artış, beta-laktam/glikopeptit grubu antibiyotiklerle sinerji açısından önemli olan yüksek düzey aminoglikozit direnci oranlarında artış ve glikopeptit direnç oranlarında görülen yükseliştir. *Enterococcus* cinsi sefalosporinlere, makrolitlere ve sülfonamitlere intrinsek direnç gösterir; bunun yanı sıra *E. faecalis* streptograminlere ve klindamisine de intrinsek direnç gösterirken *E. faecium* bunlara karşı intrinsek dirençli değildir (3).

Bakterilerdeki biyofilm yapısı, birçok dezenfektan ve antimikrobiyalın etkinliğini çeşitli yollarla azaltarak tedavisi güç kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Enterokoklar biyofilm oluşturma konusunda olağanüstü bir yeteneğe sahiptir ve bu özellik enfektif endokardit, üriner sistem enfeksiyonları ve yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlar başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonların patogeneğinde önemlidir (4).

Enterococcus cinsi bakterilerin neden olduğu, mortalite oranları yüksek olan bakteriyel endokardit ve sepsis gibi klinik tablolarda sinerjistik etkiden ötürü sıkça tercih edilen beta-laktam/glikopeptit-aminoglikozit kombinasyonuna karşı gelişen direnç endişe vericidir. Tüm bu enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklerin in vivo etkinliğinde azalmaya neden olan biyofilm formasyonu oluşumunun araştırılması da ilgi uyandıran bir husustur.

Çalışmamızda 3 farklı merkezden elde edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* kan kültürü izolatlarının çeşitli antibiyotiklere fenotipik ve genotipik (glikopeptitler, yüksek düzey

gentamisin ve yüksek düzey streptomisin direnci) direncinin araştırılması hedeflenmektedir. Yine fenotipik olarak kantitatif şekilde belirlenen biyofilm oluşumunun incelenmesi ile biyofilm oluşumu-antibiyotik direnci ilişkisinin değerlendirilmesi çalışmamızın hedeflerindendir. Çalışmamızda ayrıca izolatların çeşitli epidemiyolojik özellikleri ile kan kültürü pozitifleşme süreleri de incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*

Enterococcus türleri *Lactobacillales* takımının *Enterococcaceae* ailesine mensup tanımlanmış 58 adet türü olan, insan ve hayvanların mikrobiyotasında -özellikle gastrointestinal sistem (GİS) ve genital sistem florası- yaygın olarak bulunan gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik kok yapısında bakterilerdir. Bu bakteriler homofermantatif olup glukoz fermentasyonu sonucu gaz oluşturmamaları ile birçok streptokok türüne benzemektedir. *Enterococcus* türleri daha önce serolojik ve fenotipik yöntemlerle D grubu streptokoklar olarak sınıflandırılırken gelişen genotipik yöntemler eşliğinde taksonomisinde önemli değişikliklere uğramıştır.

Enterococcus faecalis ve *E. faecium* insanlardan izole edilen en yaygın türler olup klinik izolatların %90'ından fazlasını oluştururlar. *E. faecalis* klinik izolatlardan en sık izole edilen tür olup insan enfeksiyonlarının yaklaşık %70'inden sorumlu olmakla birlikte *E. faecium* kaynaklı enfeksiyonlar birçok ülkede gittikçe artan oranlarda gözlenmektedir. Ayrıca *E. faecium* birçok antibiyotiğe karşı daha yüksek direnç oranları gösteren, tedavisi güç enfeksiyonlara yol açmaktadır (11). Bu iki tür kadar sık olmasa da enfeksiyon etkeni olarak görülebilen diğer türler ise *E. avium*, *E. caccae*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. gallinarum* ve *E. raffinosus* gibi türler olup bunlar *faecium* ve *faecalis* dışı enterokoklar olarak adlandırılan ve günümüzde özellikle bakteriyemi ve sepsis etkeni olarak eskisinden daha sık izole edilmeye başlanan bakterilerdir (5).

2.1.1. Epidemiyoloji

Enterococcus türleri çevrede toprak, deniz suyu ve yüzey suları, çeşitli bitkiler, fermente gıda ürünleri ile insan gibi omurgalı canlıların normal gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistem flora elemanları olarak sıkça izole edilen bakterilerdir. İnsan gastrointestinal sisteminde izole edilen en yaygın türler *E. faecium* ve *E. faecalis* olup, üretim hayvanlarından en sık *E. faecium* ve bitkisel kaynaklardan ise en sık *E. casseliflavus* izole edilmektedir (6, 7).

Enterokoklar ABD'de nozokomiyal enfeksiyonların önemli etkenlerindendir. ABD'de kateter ilişkili dolaşım sistemi ve kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarında *Staphylococcus aureus*'tan sonra ikinci sıklıkta izlenmektedirler. Sağlık hizmeti ilişkili bu enfeksiyonlar ABD'de iki ayrı dalga halinde gözlenmiştir; ilk dalgada (1970'ler) meydana

gelen enfeksiyonların %90-95'inden *E. faecalis* sorumlu bulunmuşken ikinci dalgada ise (1990'lardan beri) *E. faecium* enfeksiyonlarında ciddi artış gözlenmiştir (8).

Japonya ve Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmaya göre *Enterococcus* türleri 4. en sık kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni bakteriler olarak gözlenmiştir (9). Toplum kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları üzerine odaklanan bir derlemede ise Güney ve Güneydoğu Asya'da *Enterococcus* türleri üçüncü en yaygın gram pozitif bakteri olarak tespit edilmiştir (10). Bu da enterokokların sadece sağlık hizmeti ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarında değil toplum kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında da önemli etkenler olabileceklerini göstermektedir.

Türkiye'de bir cerrahi yoğun bakım ünitesinde kan dolaşımı enfeksiyonuna yol açan izolatlar üzerinde yapılan bir çalışmada %10,8'lik oranla *Enterococcus* türleri ikinci en sık izole edilen etken olarak tespit edilmiştir (11). Yine Türkiye'de yapılan başka bir çalışmada ise 10 yıllık periyotta toplam 31.380 kan kültürü şişesinden izole edilen bakteriler arasında; ilk 5 yıllık periyotla son 5 yıllık ikinci periyot karşılaştırıldığında izole edilme sıklığında artış gözlenen tek grup *Enterococcus* türleri olarak gözlenmiştir (12).

Enterococcus türlerinin sebep olduğu enfeksiyonlarda risk faktörü olarak göze çarpan etkenler; üriner ve damar içi kateter kullanımı, eşlik eden maligniteler, kontrolsüz diyabet, uzamış hospitalizasyon, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı (özellikle sefalosporinler), gastrointestinal ve genitoüriner sisteme yönelik invaziv işlemler ve vankomisine dirençli enterokok (VRE) ile kolonize olmak şeklindedir. Gastrointestinal sistemin VRE ile asemptomatik kolonizasyonu genelde enfeksiyondan önce olur ve süreklilik gösterir; bu kolonizasyon diğer hastaların kolonize olması veya enfeksiyonu açısından da kaynak teşkil edebildiği için enfeksiyon kontrol önlemleri alınması (temas önlemleri) gerekliliğinden ötürü de önemlidir (13).

2.1.2. Patogenez

Enterococcus türleri birçok farklı virülans faktörüne sahiptirler. Bunlar arasında sitolizin/ hemolizin üretimi, süperoksit dismutaz (SOD) üretimi, hiyalüronidaz enzimi üretimi, jelatinaz üretimi, biyofilm oluşumu, enterokok yüzey proteini varlığı ve agregasyon faktörü gibi virülans faktörleri örnek olarak verilebilir (14,15). Enterokoklara özgü virülans faktörlerinin büyük çoğunluğu plazmitler üzerinde kodlanır ve bu durum doğal çevrede bulunan izolatlar arasında horizontal olarak hızla yayılmada önemli rol oynar (14, 15).

Enterococcus türlerinde yapılan çalışmalarda insan, at ve tavşan eritrositlerine etkili hücre dışı sitolizin/hemolizin üretiminin hayvan modelleri üzerindeki toksisitesi gösterilmiştir. Bu toksinlerin sadece eritrositler değil lökositler dahil birçok ökaryotik hücre üzerinde litik etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Sitolizin/hemolizin üretiminden sorumlu olan *cyl* genleri genellikle plazmitler üzerinde taşınırlar (16, 17). Uygulama-değerlendirmedeki farklılıklardan ötürü oranlar değişmekle birlikte *E. faecalis*'te hemolizin üretim oranı %20-30 oranlarında bulunurken bu oran *E. faecium*'da belirgin olarak daha düşük gözlenmektedir (16, 18).

Bakteriyemi olgularından izole edilen *E. faecalis* izolatlarının birçoğu ve bazı *E. faecium* izolatlarında yüksek miktarda hücre dışı SOD üretimi gözlenmiştir. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit anyon radikalini daha az reaktif olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür; bu enzim karışık flora kaynaklı apseler ve anaerobik enfeksiyonlardaki sık birliktelik açısından da bakteriye avantaj sağlar (18, 19).

Jelatinaz (GelE) ve serin proteaz (SprE) enterokok türlerinin virülansında önemli olan proteazlardandır (20). Yapılan çalışmalarda jelatinazın kollajen, fibrinojen gibi konağın bağ doku proteinlerini parçalayan bir çinko-metalloproteaz olmasının yanında biyofilm oluşumuna katkı sağladığı da gösterilmiştir. Jelatinazın kromozomal *GelE* geni tarafından kodlandığı ve çeşitli hayvan modellerinde tıpkı sitolizin/hemolizinler gibi patogeneizde kolaylaştırıcı bir etki yarattığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda jelatinaz aktivitesi *E. faecalis* izolatlarında *E. faecium* izolatlarına oranla daha sık tespit edilmiştir (20, 21).

Plazmit aracılı bir gen olan *HylEfm* geninin kodladığı hiyaluronidaz enzimi hiyalüronik asit gibi bağ dokusunun çeşitli ekstraselüler matriks elemanlarını parçalayarak *Enterococcus* türü bakterilerin doku içindeki yayılımından sorumlu bir virülans faktörüdür (22). Birçok çalışmada *HylEfm* geni sitolizin/hemolizin ve jelatinaz aktivitesinin aksine *E. faecium* izolatlarında *E. faecalis* izolatlarına göre daha sık tespit edilmiştir (22, 23).

Kümelenme maddesi proteinleri (Agg) mikroorganizmaların çok daha sık oranda plazmit aktarımına girebilmesi için kümelenmelerini sağlayan proteinlerdir. Cinsiyet feromonu olarak da adlandırılan bu maddeler konjugasyonda potansiyel alıcı hücre tarafından salınan küçük peptitler olup verici hücrelerde bir toplanma yanıtı oluşturmaları açısından eşsizdirler. Kümelenme maddesi proteinlerinin çeşitli hücre kültürü çalışmalarında enterokok adezyonunu kolaylaştırdığı ve hayvan endokardit modellerinde vejetasyonun büyümesine bakteri kümeleşmesini arttırma aracılığıyla destek olduğu gösterilmiştir (16, 24). pAD1 gibi

bazı plazmitler hem kümelenme maddesi proteinlerini hem de bazı antibiyotik direnç genlerini aynı anda taşımaları açısından kayda değer önem arz ederler. Yine feromon aracılı konjugasyonla gen transferi yapan bazı plazmitlerin sitolizin/hemolizin gibi virülans faktörlerini kodlayan genleri de taşıyabildikleri belirtilmektedir (24, 25).

E. faecalis ve *E. faecium*; ekstraselüler yüzey proteini (Esp) olarak adlandırılan ve hücre yüzeyinden, yüzey altına çekilerek mikroorganizmanın antikor yanıtına karşı korunmasında önemli rol oynayan özellikli bir yüzey proteini kodlarlar (26). Birçok çalışmada Esp proteininin biyofilm oluşumunun başlangıç aşamasında önemli rol oynadığı da gösterilmiştir (27, 28). Enterokokların hücre yüzeyinde bulunan ve birçok diğer bakteride olduğu gibi adezyon ve biyofilm oluşumunda görev alma gibi rolleri olan pilusların da enterokokların virülansında önemli rol aldığı gözlenmiştir (29). Gram pozitif bakterilerin ortak yapıları olan lipoteikoik asit (LTA) ile kapsül formasyonu ile ilişkili bazı polisakkarit yapıların diğer birçok bakteride olduğu gibi kompleman aracılı opsonizasyona ve fagositoza karşı enterokokların korunmasında rol oynadığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (30). Enterokokların virülans faktörleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Enterokokların virülans faktörleri

Virülans Faktörleri	Virülanstaki Roller
Sitolizin/Hemolizin üretimi	Eritrosit, lökosit gibi çeşitli hücreler üzerine sitotoksik etki
Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi üretimi	Süperoksit radikallerinin toksik etkilerine karşı direnç
Hiyalüronidaz enzimi üretimi	Bağ doku üzerine etki ile invazyonun kolaylaşması, adezyonu kolaylaştırma
Jelatinaz enzimi üretimi	Bağ doku yıkımı, biyofilm oluşumuna katkı
Agregasyon faktörü üretimi	Endokardit vejetasyonu oluşumuna katkı, plazmit aktarımı için bakteri kümelenmesinde artış
Ekstraselüler yüzey proteini (Esp) ve Lipoteikoik asit (LTA)	Adezyon ve biyofilm oluşumuna katkı
Quorum Sensing sistemi	Çevre adaptasyonu, biyofilm oluşumunun düzenlenmesi
Geniş ısı aralığında üreyebilme ve kuruluk direnci	Olumsuz çevre şartlarına adaptasyon
Feromon ilişkili gen aktarımı	Artmış plazmit aracılı konjugasyon oranı
Antibiyotik direnç genleri	Antibiyotik direnci

2.1.3. Klinik Hastalıklar

Enterokokların neden olduğu en sık enfeksiyon türü üriner sistem enfeksiyonları (ÜSE) olup bu bakterilerin etken olduğu üriner sistem enfeksiyonlarının çoğu üriner sistem kateterizasyonu ile ilişkili nozokomiyal enfeksiyonlardır (31). Öyle ki yapılan geniş çaplı bir çalışmada nozokomiyal ÜSE'ler arasında tüm etkenler içinde en sık rastlanan üçüncü etken olarak tespit edilmişlerdir (32). Buna karşın üriner sistemde yapısal anomalisi olmayan genç ve sağlıklı kadınlarda enterokoklara bağlı üriner sistem enfeksiyonları oldukça nadir olup bu gruptaki hastaların enfeksiyon etkenlerinin %5'inden azında enterokoklar rol almaktadır. Kateterle ilişkili enterokokal ÜSE'li pek çok hasta başlangıçta sadece kolonize olup enfekte değildir, kateterin zamanında çıkarılmasıyla enfeksiyon çoğunlukla önlenir. IDSA' nın kanıta dayalı rehberlerinde belirtildiği üzere idrarda enterokokların varlığı genelde asemptomatiktir ve üst üriner sistem enfeksiyonu gelişme riski daha yüksek olan; gebe hastalar, ürolojik girişim yapılacak hastalar ve diyabet vb. komorbiditesi olan hastalar hariç asemptomatik bakteriürinin tedavisi önerilmemektedir (33).

Enfektif endokardit (EE), kalp kapakları (doğal veya protez), mural endokard ve kalp içi cihazlarla ilişkili (kalıcı kalp pili ve/veya defibrilatörler) enfeksiyon olarak tanımlanan, önemli morbidite ve mortalite kaynağı olan bir klinik tablodur. Enterokoklar yapılan birçok çalışmada streptokok (özellikle viridans grup) ve stafilokokların ardından en sık üçüncü endokardit etkeni iken enterokoklar arasında ise en sık *E. faecalis* etken olarak gözlenmiştir (34, 35). Enterokoklara bağlı EE prostetik kapaklı ve ileri yaşlı hastalarda daha sık görülür ve çoğunlukla nozokomiyal olarak kazanılmışlardır (35, 36). Bu hastalarda endokardit sıklıkla GİS (örn. fiberoptik sigmoidoskopi, kolonoskopi vb) ve genitoüriner sistemi (GÜS) (örn. sistoskopi, prostatektomi vb) invaze eden işlemler sonrası meydana gelir.

Çoğu enterokok bakteriyemisi ise endokarditle ilişkisiz bakteriyemilerdir. Enterokok bakteriyemisi için birçok kaynak mevcuttur; bunlar arasında üriner sistem, intraabdominal/pelvik enfeksiyonlar, kolanjit, yara yeri enfeksiyonları ve damar içi kateterler en sık olanlardır. Özellikle intraabdominal/pelvik enfeksiyonlar ve kolanjit sonrası gelişen bakteriyemiler başta olmak üzere polimikrobiyal bakteriyemiler enterokok bakteriyemilerinde sıklıkla gözlenir (37).

Enfeksiyon bölgesi gereği intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlarda enterokoklar genellikle diğer lokal flora elemanı olan aerob ve anaerob mikroorganizmalarla birlikte bulunurlar.

Spontan veya periton diyalizi ilişkili peritonit vakalarında genellikle polimikrobiyal enfeksiyonlara yol açsalar da daha az sıklıkta monomikrobiyal enfeksiyonları da gözlenmiştir (38). Ayrıca salpenjit, pelvik inflamatuvar hastalık (PİH) gibi genitoüriner enfeksiyonlarda da yine diğer enfeksiyon etkeni mikroorganizmalarla birlikte bulunabilirler (38, 39). Cerrahi yara yeri enfeksiyonları ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında anaeroplara, *S. aureus* ve çeşitli gram negatif basiller gibi birçok bakteriyle birlikte etken olarak gözlenebilirler. Menenjit ve yenidoğan sepsisi ise daha nadir olmakla birlikte neden olduğu diğer enfeksiyonlar arasındadır (38, 40).

2.1.4. Laboratuvar Tanısı

Enterokokların tanımlanmasında kullanılan çok çeşitli fenotipik ve genotipik testler mevcuttur. Mikrobiyolojik olarak enterokokların laboratuvarındaki tespiti her zaman için hastalık etkeni olduğu anlamına gelmez. Örneğin; enterokokların bronkoalveolar lavaj ve korumalı fırça biyopsisi gibi alt solunum yolu örneklerinden -saf kültür ve yoğun üremesi haricinde- tespiti kolonizasyon veya kontaminasyona işaret eder (41). Yine üriner sistem örneklerinde *Enterococcus* türleri olağan üriner sistem patojenleri olmalarına rağmen; kesin tanımlama yapmak ve antibiyotik duyarlılık sonucu vermek için invaziv yolla alınmayan örneklerde mililitrede en az $\geq 10^4$, invaziv yolla alınan örneklerde ise mililitrede en az $\geq 10^3$ koloni oluşturan birim (KOB) kadar bakteri tespit etmek gerekmektedir (42, 43). Kan kültürü, yara örneği gibi diğer birçok örnekten enterokokların tespiti ise klinik bulgular ve diğer laboratuvar bulguları eşliğinde değerlendirilmek kaydıyla çoğunlukla enfeksiyona işaret eder.

Fenotipik tanımlamada ilk basamak her zaman enterokok olduğundan şüphelenilen kolonilerden gram boyama yapılmasıyla başlar. Koyun kanlı agar da kolonileri bir gecelik inkübasyon sonrası 1-2 mm boyutlarında, düzgün kenarlı, gri, hemolizsiz ya da alfa hemolitik veya nadiren beta hemolitik olan kolonilerdir. Gram boyamada enterokoklar çiftler veya kısa zincirler şeklinde, daha az sıklıkla da kümeler halinde bulunan gram pozitif koklardır. Enterokoklar tıpkı streptokoklar gibi homofermentatif bakterilerdir; yani glukoz fermentasyonunun tek ürünü laktik asit olup gaz oluşumu gözlenmez. Gram boyamanın ardından yapılan katalaz testi sonucunun negatifliği ile bakterinin *Streptococcus* ve onunla ilişkili cinslerden biri olduğunun ön tanımlaması yapılmış olur.

Bu ön tanımlamadan sonra olası tanımlamada ve birçok streptokok türünden ayrımı için fenotipik testler bulunmaktadır. Bunlar arasında en yaygın kullanılan testlerden biri

pirolidonil arilamidaz enzimini tespit eden pirolidonil arilamidaz (PYR) testidir. Beş dk gibi oldukça kısa sürede sonuç veren bu testin ticari olarak geliştirilmiş ve oldukça kolay uygulanan birçok versiyonu mevcut olup Grup A- β -hemolitik streptokoklarda (*Streptococcus pyogenes*) ve enterokoklarda pozitif sonuç vermeleri yüksek düzeyde duyarlılık ve özgüllük gösterir (44). Enterokoklar birçok streptokok türünden, 10-45°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında (*Enterococcus dispar* gibi birkaç istisna hariç) ve pH 9.6 gibi bazik bir pH’da da üreyebilmeleri ile de ayrılırlar.

Safra-eskülin testi D grubu streptokoklar ve enterokokları diğer katalaz negatif, gram pozitif koklardan ayırmada önemli bir testtir. Bu iki grup bakteri %40 gibi yüksek bir safra konsantrasyonunda üreyebilir ve bu konsantrasyonda eskülini hidrolize edebilir. Test sonucu güvenilir olup yüksek bir duyarlılık ve özgüllük göstermektedir (45). Enterokoklar; D grubu streptokoklardan ise tuz tolerans testi aracılığıyla ayrılabilirler. *Enterococcus* türleri tuza toleran olduğu için %6,5’lik tuz konsantrasyonunda üreyebilirken D grubu streptokoklar bu tuz konsantrasyonunda üreme göstermez.

Enterokoklar daha önce D grubu streptokoklar içinde sınıflandırmış olan bakterilerdir. Lancefield sınıflandırmasında kullanılan diğer hücre duvarı antijenleri olan A, B, C, F veya G antijenlerinin aksine D grubu antijeni bir hücre duvarı polisakkariti değil, bir hücre duvarı LTA’sı olup enterokok türlerinin büyük kısmı (%90’ından fazlası) hücre duvarında bu antijene sahiptir ve lateks aglütinasyon gibi serolojik testlerde bu antijene karşı seropozitiflik gösterebilirler (46). Bunlar dışında kullanılan diğer bazı fenotipik testler, karbonhidrat fermentasyon testleri (örneğin *E. faecium* arabinoz pozitifken; *E. faecalis* arabinoz negatif), pigmentasyon oluşumunun tespiti (*E. casseliflavus*’un sarı pigment yapması) ve hareket tespiti (sadece *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* hareketli) gibidir. Ticari olarak yukarıda sayılan birçok fenotipik testi kendi bünyesinde gerçekleştirerek yüksek duyarlılık ve özgüllükle bakteri tanımlaması yapan otomatize sistemler (örn. Phoenix, Vitek 2 compact vb.) mevcuttur.

“Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS) mikroorganizmalara ait biyolojik moleküllerin [özellikle ribozomal ribonükleik asit (RNA) molekülleri] tespiti ile elde edilen sonuçların sistemde mevcut olan veri tabanındaki referans mikroorganizmalarla uyumlarına göre cins veya tür bazında mikroorganizma tanımlaması yapabilen oldukça hızlı ve etkin bir yöntemdir. İsveç’te yapılan bir çalışmada hem Microflex LT kütle spektrometri cihazı (Bruker Daltonik, Almanya) hem

de Vitek MS' in (BioMérieux, Fransa) kullanıldığı bir çalışmada araştırmacılar Vitek 2 compact sonuçları ile karşılaştırdıklarında her iki kütle spektrometre cihazının 132 enterokokun tamamını doğru tanımlarken, Vitek 2 cihazının ise 121 (%91,6) izolatu doğru tanımladığını görmüşlerdir (47). Geliştirilen 16s rRNA ve tüm genom dizileme (TGD) teknolojisi gibi genotipik yöntemler MALDI-TOF MS dahil olmak üzere diğer tüm fenotipik tanı yöntemlerine oranla daha başarılı şekilde tanı koymayı ve yeni türler tanımlamayı mümkün kılmaktadır. Süperoksit dismutaz enzimini kodlayan *sodA* ve uzama faktörü “Tu”yu kodlayan *tuf* gibi genler ile 16s rRNA dizilemesi enterokokları diğer cinslerden ayırmada; *ddl* (D-alanine:D-alanine ligase) geni ise *E. faecalis* ile *E. faecium* ayırımında oldukça faydalıdır (48, 49).

2.2. Enterokok Kaynaklı Enfeksiyonlarda Tedavi ve Antibiyotiklere Direnç

Enterokoklar özellikle sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların önde gelen etkenlerindendir. Bu durumdan enterokokların; ısı, pH, kuruluk gibi olumsuz çevre şartlarına adaptasyon yetenekleri, biyofilm oluşturma ve antimikrobiyallere kazanılmış direnç geliştirme özellikleri gibi çeşitli faktörler sorumlu tutulmaktadır (50, 51). Yüksek düzey aminoglikozit direnci ve glikopeptit direnci, mevcut tezin başlıca araştırma konuları oldukları için farklı başlıklar altında incelenmiştir.

DSÖ tarafından antibakteriyel direnç profili ve birçok enfeksiyondaki artan insidansından ötürü ESKAPE patojenleri (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aereginosa* ve *Enterobacter* türleri) arasında gösterilen *E. faecium*, enterokok türleri arasında en dirençli tür olarak dikkat çekmektedir. Glikopeptit dirençli *E. faecium*, DSÖ tarafından öncelik grubu 2 (yüksek öncelikli) mikroorganizmalar arasında gösterilen bir mikroorganizmadır (2, 52).

Meydana gelen enfeksiyonun çeşidi ve anatomik bölgesi, enfeksiyona etken olan enterokokun türü, eşlik eden komorbiditelerin varlığı ve mikroorganizmanın direnç profili gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak tedavide tercih edilen antibiyotikler değişiklik göstermektedir. Üriner sistem enfeksiyonlarında, özellikle ürosepsis mevcut olmadığı ve etkenin *E. faecalis* olduğu durumda ampisilinin tek ilaç olarak kullanımı çoğunlukla tedavide yeterli olabilmektedir (53). Ampisilinin idrarda oldukça yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmesinden ötürü bazı üriner sistem enfeksiyonlarında in vitro direnç tespit edilmiş olsa bile in vivo olarak yeterli etkinlik gösterebildiği gözlenmiştir (53, 54). Amerika’da yapılan 28 çalışmanın değerlendirildiği bir derlemede idrardan izole edilen *E. faecium*

izolatlarının %4,4'ü, *E. faecalis* izolatlarının ise %98,5'i ampisiline duyarlı olarak tespit edilmiştir (55). Yine aynı derlemede en yüksek in-vitro duyarlılık yüzdelere sahip iki antibiyotik sırasıyla linezolid (%99,5) ve nitrofurantoin (%96,1) olarak gözlenmiştir (55). Komplike olmayan ÜSE'lerde tercih edilebilen diğer antibiyotikler nitrofurantoin, fosfomisin ve siprofloksasin gibi kinolonlar iken komplike ÜSE'lerde ise glikopeptitler, karbapenemler gibi ajanlar ile ampisilin/vankomisin-aminoglikozit kombinasyonu gibi tedavi alternatifleri mevcuttur (56).

Endokardit gibi oldukça ciddi seyredabilen enfeksiyonlarda ise monoterapi önerilmemekte ve tedavide bakterisidal etki gösteren ilaçların kullanımı gerekmektedir. Tedavide en sık kullanılan rejim, hücre duvarına karşı etkili olan bir ajan (özellikle ampisilin veya vankomisin) ile protein sentez inhibitörü olan aminoglikozitlerin (en sık gentamisin) kombinasyonu şeklinde olmaktadır (57, 58). Yüksek düzey aminoglikozit direnci, ampisilin direnci veya glikopeptit direnci gözleendiğinde çeşitli alternatif tedavi rejimleri mevcuttur. Bunlar arasında seftriakson ve ampisilin gibi iki beta-laktam ajanın kombinasyonu veya daptomisin, linezolid, karbapenemler, dalbavansin/telavansin, rifampisin ve fosfomisin gibi ajanların çeşitli kombinasyonları ile geliştirilen rejimler örnek olarak gösterilebilir (59).

Enfektif endokardit menşeli veya değil kan dolaşımı enfeksiyonlarında vankomisin direnci (özellikle *E. faecium*'da) oldukça önemli bir problemdir. 1980'li yıllarda enterokoklarda vankomisin direncinin tanımlanmasından sonra Amerika'da *E. faecium* izolatlarında 2000'li yılların başında %60 ve 2010'lu yıllarda ise -son birkaç yıldaki azalmalarla %80'lerden %65'lere- %65 gibi yüksek direnç oranları dikkat çekmektedir (60). Bu yüzdelere tür bazında *E. faecalis* izolatlarında ve coğrafik bölge açısından birçok Avrupa ülkesinde çok daha düşüktür. CAESAR 2019 Türkiye verilerine göre kan ve beyin omurilik sıvısından elde edilen *E. faecalis* izolatlarının %5'i ampisiline dirençli iken, *E. faecium* izolatlarının %89'u ampisiline dirençlidir. Yine bu verilere göre *E. faecalis* izolatlarının %1'i vankomisine dirençli olarak gözlenmişken, *E. faecium* izolatlarının %13'ü vankomisine dirençli olarak bulunmuştur. Test edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının hiçbirisinde ise linezolid direnci gözlenmemiştir. Glikopeptit direnci gözleendiği durumda bazen tek başına fakat çoğunlukla kombinasyon tedavisinde kullanılabilen ilaçlar arasında beta-laktam grubu antibiyotikler-aminoglikozit kombinasyonu, daptomisin, oksazolidinonlar, karbapenemler, streptograminler (kinupristin/dalfopristin), dalbavansin/telavansin, eravasklin, omadasiklin ve fosfomisin yer almaktadır. Bunların bir kısmı endikasyon dışı olarak kombinasyon rejimlerinde yer almaktadırlar (61).

2001 yılında birçok Avrupa ülkesi ve Amerika'dan dahil edilen izolatlarla yapılan bir çalışmada enterokoklar deri ve yumuşak doku enfeksiyonu etkeni olan patojenler arasında ABD (%24,9) ve İspanya'da (%18,1) birinci sırada yer alırken çalışmaya katılan diğer ülkelerde ise (Fransa hariç) *S. aureus*'un ardından en sık izole edilen mikroorganizma olarak gözlenmiştir. Bu çalışmanın verilerine göre Avrupa ülkelerinde enterokokların duyarlılık oranının en yüksek olduğu antibiyotikler sırasıyla teikoplanin, vankomisin ve ampisilin şeklinde iken, ABD'de ise bu sıralama vankomisin, ampisilin ve levofloksasin şeklindedir. Bu çalışmadaki hastaların yoğun bakım hastaları olmaları ve tespit edilen bu yüksek enterokok prevalansında yoğun bakımlardaki enterokok kolonizasyonunun yüksek olmasının önemli rol oynadığı da vurgulanmıştır (62). Tedavide ampisilin, vankomisin, teikoplanin, karbapenemler, oksazolidinonlar, daptomisin, streptograminler (kinupristin/dalfopristin), dalbavansin/telavansin, tigesiklin ve eravasiklin gibi antimikrobiyal ajanlar tercih edilebilmektedir (63). İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlarda anaerob bakteriler ve gram negatif veya gram pozitif birçok bakteriyle birlikte enfeksiyon yapma eğilimindeki enterokoklarda tedavide ampisilin-sulbaktam, piperasilin-tazobaktam, karbapenemler, vankomisin, teikoplanin, tigesiklin, eravasiklin ve linezolid kullanılabilir (64).

2.2.1. Antibiyotik Direncinden Sorumlu Mekanizmalar

Enterokoklar intrinsek veya kazanılmış yolla birçok antimikrobiyal ajana direnç geliştirebilmektedirler. Gelişen genotipik ve fenotipik yöntemler eşliğinde direnç mekanizmalarını anlamak daha kolay hale gelmiştir. 1980'li yıllara kadar Grup D streptokoklar arasında olduğu varsayılan enterokokların farklı bir cins olarak ayrılmasında moleküler çalışmalarla beraber diğer streptokok türlerine oranla birçok beta-laktam (özellikle sefalosporinler) ve diğer gruptan antimikrobiyal ajana dirençli oluşu önemli rol almıştır.

Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) hücre duvarının esansiyel yapılarından biri olan peptidoglikan tabakanın oluşturulması ve yeniden yapımında rol alan proteinlerdir. Beta-laktam yapıdaki antibiyotikler bu proteinleri hedef alarak hücre duvar sentezi üzerinde inhibitör etki gösteren bakterisidal antibiyotiklerdir. *E. faecalis*'ten sentezlenen PBP-4 ve *E. faecium*'dan sentezlenen PBP-5 düşük afiniteli PBP'ler olarak adlandırılır ve beta-laktam ajanlara karşı mevcut dirençten ana sorumlu mekanizma bu düşük afiniteli PBP'lerin varlığıdır (65). Bu PBP'lerin sadece aşırı üretimi değil, *psr* (*E. faecium*'da) ve *psr benzeri*

(*E. faecalis*'te) PBP represör genlerindeki mutasyonlar, PBP'leri kodlayan genlerdeki mutasyonlar ve nadiren beta-laktamaz üretimi de penisilin direncinde rol alan mekanizmalardır. Mutant olmayan, sadece artmış düşük afiniteli PBP üretimi intrinsek bir direnç mekanizması olup düşük düzey penisilin ve orta-yüksek düzey sefalosporin direncinden sorumlu iken sporadik gelişen ve mutant PBP'lerin olduğu ve aşırı üretildiği durumlar ise yüksek düzey penisilin direnci ve karbapenem direncinden sorumludur (66, 67).

Kinupristin ve dalfopristin sırasıyla streptogramin B ve streptogramin A olarak da isimlendirilen, streptogramin sınıfına ait, birlikte kullanımı halinde güçlü sinerjistik etki gösteren, intravenöz (İV) kullanımı olan antibiyotiklerdir. Bakteriyel ribozomun 50S alt birimine bağlanarak protein sentezinin hem erken basamaklarındaki reaksiyonları (dalfopristin) hem de geç basamaklarda ki peptid zincirin uzaması için gerekli olan reaksiyonları (kinupristin) inhibe ederek etki gösterirler. *E. faecalis* izolatları intrinsek direnç gösteriyor olmakla birlikte *E. faecium*'un sebep olduğu enfeksiyonlarda kinupristin/dalfopristin kombinasyonu başarıyla kullanılabilir (68). Bu ilaçlara gelişen dirençte en sık görülen mekanizma makrolit-linkozamit-streptogramin_B tipi (MLS_B) direnç olarak adlandırılan ve 50S rRNA'nın 23S alt biriminin metilasyonu sonucu gelişen direnç olup bu mekanizma ile makrolit ve linkozamit grubu antibiyotiklere de çapraz direnç gözlenir (69).

Linezolid oksazolinidon grubu bir antibiyotik olup, 50S alt biriminin 23S rRNA'sına bağlanarak fonksiyonel bir 70S başlatma kompleksinin oluşumunu engeller ve bu yolla etki gösterir. Direnç enterokoklarda nadir olup en sık gözlenen mekanizma 23S rRNA'yı kodlayan genlerdeki G2576T gibi aminoasit değişikliğinin gözlemlendiği mutasyonlardır. Plazmit aracılı kazanılan ve içinde linkozamidler, streptogramin A ve linezolid de bulunan 5 farklı ilaç grubuna karşı direnç gelişiminden sorumlu olan ve farklı birçok bakteri türünde de karşılaşılabilen *cfr* geni de dirençte rol alabilmektedir (70).

Daptomisin bakteriyel hücre membranının hızlı depolarizasyonu ve bunun sonucunda potasyum gibi elektrolitlerin hücre içinden dışına sızıışı aracılığıyla bakteriyel hücre ölümüne yol açan lipopeptid yapıda bir antibiyotiktir. Enterokoklarda daptomisin direnci sık olmamakla birlikte gelişen direnç çoğunlukla ilacın hücre membranına bağlanmasını azaltan yapısal değişikliklere sebep olan sporadik mutasyonların varlığında gözlenir. Bu mutasyonlar en sık *cls*, *gdpD* ve *liaFSR* genlerinde meydana gelir (71).

Tigesiklin; minosiklinin bir türevi olup glisilsiklin antibiyotik grubunun ilk üyesidir. Gram pozitif, gram negatif, anaeroplara gibi geniş yelpazedeki birçok bakteriye karşı bakteriyostatik etki gösteren ve etki mekanizması tetrasiklin grubu gibi 30S bakteriyel ribozomal alt birime bağlanarak aminoasit sentezini inhibe etmek olan bir antibiyotiktir. Yapılan bir süveyans çalışmasında 2004-2013 yılları arasında toplanan 20.782 izolatın (14.615 *E. faecalis* ve 6.167 *E. faecium*) %99.7'si tigesikline duyarlı olarak gözlenmiştir (72). Başka direnç yollarının da dirençte önemi olabileceği düşünülmekle birlikte 30S ribozomal alt birimin S10 ribozomal proteinini kodlayan *rpsJ* genindeki çeşitli mutasyonların dirençteki rolü gösterilmiştir (73). Eravasiklin ise yeni geliştirilmiş bir tetrasiklin türevi olup florosiklin antibiyotik grubunun bir üyesidir ve VRE' ler de dahil olmak üzere eravasiklin direnci enterokoklarda nadirdir (74). Dirençte tigesiklin direncinde rol alan mekanizmalarla birlikte EmeA gibi bazı dışa atım pompaları aracılı artmış dışa atım da önemli görünmektedir (74).

Florokinolonlar DNA sentezinde önemli rolleri olan DNA giraz ve topoizomera 4 enzimlerini inhibe ederek birçok gram pozitif ve gram negatif bakteri üzerinde bakterisidal etki oluşturan antibiyotiklerdir. Levofloksasin ve moksifloksasin gibi görece daha fazla etkinlik gösteren örnekleri olmakla birlikte kinolonların enterokoklar üzerindeki etkinlikleri sınırlıdır. DNA giraz ve topoizomera 4 enzimlerini kodlayan *gyrA* ve *parC* genlerindeki nokta mutasyonlar ile NorA benzeri dışa atım pompalarının mevcudiyeti enterokoklardaki florokinolon direncinden sorumlu görülmektedir (75). Enterokoklara kazanılmış dirençte rol oynayan mekanizmalar Tablo 2.2'de listelenmiştir.

Tablo 2.2. Enterokok tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

	Birincil Mekanizma	Diğer Mekanizmalar
Ampisilin	PBP-4 ve PBP-5 gibi düşük afiniteli PBP'lerin aşırı sentezi	Mutant PBP oluşumu, Beta-laktamaz üretimi
İmipenem	PBP-4 ve PBP-5 gibi düşük afiniteli PBP'lerin aşırı sentezi	Mutant PBP oluşumu, Beta-laktamaz üretimi
Florokinolonlar	<i>gyrA</i> ve <i>parC</i> genlerindeki nokta mutasyonları	NorA benzeri dışa atım pompalarının mevcudiyeti
Kinupristin-Dalfopristin	50S rRNA'nın 23S alt biriminin metilasyonu (MLS _B)	<i>msrA</i> geni ilişkili eflüks aracılı dışa atım
Linezolid	23S rRNA'yı kodlayan genlerde G2576T gibi mutasyonlar	cfr geni aracılı 23S rRNA metilasyonu
Daptomisin	<i>cls</i> , <i>gdpD</i> ve <i>liaFSR</i> gibi genlerde ilacın hücre membranına bağlanımını değiştiren mutasyonlar	mprF aracılı hücre membranı lipidlerinin modifikasyonu ve yüzey yükü değişimi
Tetrasiklin	tet(K), tet(L) gibi genler aracılı dışa atım	tet(M) ve tet(O) gibi ribozomal korunma proteinlerindeki mutasyonlar
Tigesiklin	30 S ribozomal alt birimin S10 ribozomal proteinini kodlayan <i>rpsJ</i> genindeki çeşitli mutasyonlar	EmeA gibi bazı dışa atım pompaları aracılı dışa atım, tet(M) ve tet(O) gibi ribozomal korunma proteinlerindeki mutasyonlar
Eravasiklin	30 S ribozomal alt birimin S10 ribozomal proteinini kodlayan <i>rpsJ</i> genindeki çeşitli mutasyonlar	EmeA gibi bazı dışa atım pompaları aracılı dışa atım, tet(M) ve tet(O) gibi ribozomal korunma proteinlerindeki mutasyonlar

2.2.2. *Enterococcus* Türlerinde İntrensek Direnç

İntrensek direnç mikroorganizmanın plazmit, transpozon gibi kalıtsal elemanların etkisinden bağımsız olarak; farklı metabolik özellikleri veya antimikrobiyalin hedeflediği yapısal özellikten mahrum oluşu gibi özellikleri aracılığıyla gösterdiği ve türün hemen hemen tüm üyelerinin sahip olduğu direnç fenotipidir. EUCAST bu terim yerine “dirençli olması beklenen fenotip” terimini kullanmış ve tanımını o türün tüm izolatlarının >%90'ının karakteristik direnç mekanizması sergilemesi veya minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) farmakokinetik/farmakodinamik (FK/FD) sınır değerinin üzerinde olması şeklinde yapmıştır (3).

E. faecium'da ampisilin direnci %95 gibi oldukça yüksek oranlarda gözlenirken bu durum *E. faecalis*'te geçerli değildir. Bu yüksek direnç oranında birkaç mekanizma rol oynamakta olup düşük düzey penisilin direncinde en sık yol mutant olmayan düşük afiniteli PBP-5'in aşırı sentezi iken yüksek düzey dirençte çoğunlukla bu aşırı senteze birçok nokta mutasyonu da eşlik eder. Bir diğer mekanizma ise D,D-transpeptidaz yerine beta-laktam ajanların

bağlanamadığı L,D-transpeptidaz ve D,D-karboksiptidazın üretimidir. PBP-5 yolağının aksine bu yolak imipeneme karşı direnç yol açmamaktadır. Çok daha nadir görülen beta-laktamaz enzimi üretimi yolağı ise transpozonlar aracılığı ile kazanılmış bir direnç mekanizmasıdır. Sefalosporinlere karşı gelişen intrinsek dirençte de yine PBP-4 ve PBP-5 gibi düşük afiniteli PBP'lerin aşırı üretimi sorumludur (67).

Enterokoklar aminoglikozitlere karşı intrinsek olarak düşük düzey direnç göstermektedirler ve bunun temel sebebi ise bu grubun aktivite gösterdiği bölgeye sınırlı geçişi ve yeterli konsantrasyonda ulaşamamasıdır. Ayrıca *E. faecium*'da kromozomal olarak kodlanan aminoglikozit 6' asetiltransferaz (AAC(6')-II) enzimi tobramisin ve kanamisine orta-yüksek düzey dirençten sorumlu olup beta-laktam ajanlarla sinerjinin önüne geçer. Ayrıca yine *E. faecium*'un *efmM* geninin kodladığı bir metiltransferaz, aminoglikozitlerin hedef bölgesi olan 30S rRNA'nın 16S alt birimini metilleyerek dibekasin, tobramisin ve kanamisine karşı düşük-orta düzey intrinsek direnç yol açar (67, 75).

E. faecalis linkozamidlere (klindamisin gibi), kinopristin/dalfopristine ve makrolitlere karşı intrinsek direnç gösterirken *E. faecium*'da ise bunlardan sadece makrolitlere karşı intrinsek direnç gözlenir. Bu durumdan sorumlu olan mekanizma ise ATP bağlayıcı kaset eflüks pompaları aracılığıyla ilacın artmış dışa atımıdır. Linkozamid direncinde bu pompaları kodlayan gen *lsrA* iken streptograminler için *msrC* genidir (67, 75).

Birçok bakteri çevreden folat alımı mekanizmalarına sahip olmadığı ve folat nükleik asit sentezi için temel bir rol oynadığı için de novo folat sentez yollarına sahiptirler. Trimetoprim; dihidrofolat redüktaz enzimini ve sülfametoksazol ise dihidropteroat sentaz enzimini inhibe ederek folat sentezini bloke eden sinerjistik etkili bir antibiyotik kombinasyonudur. Enterokoklar bu yolağa ihtiyaç duymadan çevreden folik asiti temin edebildiği için bu kombinasyona karşı intrinsek olarak dirençlidir. Enterokoklar arasında *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* ise glikopeptitlere karşı düşük düzey intrinsek direnç sebep olan kromozomal *vanC* operonu ile ilişkili indüklenemez ve aktarılamaz bir direnç göstermektedir.

2.2.3. Enterococcus Türlerinde Yüksek Düzey Aminoglikozit Direnci

Enterokoklar aminoglikozitlere karşı temel olarak enfeksiyon bölgesinde aktif olmaya yetecek konsantrasyon düzeyinde bulunamamalarından ötürü düşük düzey direnç gösterirler. Gentamisin ve streptomisin eğer yüksek düzey aminoglikozit direnci yoksa

özellikle beta-laktam/glikopeptit antibiyotiklerle beraber kullanımlarında sinerji gösterebilmeleri açısından önemli moleküllerdir.

Yüksek düzey aminoglikozit direncini saptamada kullanılan antibiyotik konsantrasyonları ve yöntemler EUCAST ile CLSI arasında bazı değişiklikler göstermektedir. EUCAST disk difüzyon yöntemi için 30 µg gentamisin ve 300 µg streptomisin içeren disklerin katyonu ayarlanmış Mueller Hinton Agar (MHA)'da kullanımını önermekte, sıvı mikrodilüsyon yöntemi içinse Mueller Hinton sıvı besiyeri (MHB) besiyerini önermektedir (76). CLSI ise disk difüzyon yöntemi için 120 µg gentamisin ve 300 µg streptomisin içeren disklerin katyonu ayarlanmış MHA'da kullanımını önermekte, sıvı mikrodilüsyon yöntemi içinse MHB yerine Brain Heart İnfüzyon (BHI) sıvı besiyeri kullanımını önermektedir. CLSI ayrıca BHI agarın gentamisin ve streptomisin içeren modifiye şekline bakteri inokülasyonu sonrası üremenin değerlendirildiği bir agar dilüsyon yöntemi de tanımlamıştır. Değerlendirmede bir koloniden fazla olan her üreme dirence işaret etmektedir (77). Yöntemlerde bazı farklılıklar gözleendiği gibi EUCAST ve CLSI sınır değerleri de yüksek düzey aminoglikozit direnci tespitinde farklılıklar göstermektedir.

Enterokoklardaki yüksek düzey aminoglikozit direnci insidansı gentamisin ve streptomisin için farklılıklar gösterebildiği gibi coğrafi olarak da ciddi farklılıklar gözlenebilmektedir. İran'da 127'si *E. faecalis*, 62'si *E. faecium* olan toplam 195 enterokokun dahil edildiği 2019 yılında yapılan bir çalışmada *E. faecalis* izolatlarında yüksek düzey gentamisin direnci (YDGD) %35,5 ve yüksek düzey streptomisin direnci (YDSD) %40,2 iken *E. faecium* izolatlarında bu oranlar sırasıyla %69,8 ve %50,5 olarak gözlenmiştir (78). Türkiye'de 2000-2015 yılları arasında yapılan 27 adet *E. faecalis* ve 21 adet *E. faecium* çalışmasını dahil eden bir meta-analiz çalışmasının verilerine göre *E. faecalis* izolatlarında YDGD oranı %37,1 ve YDSD oranı ise %43,2 iken *E. faecium* izolatlarında bu oranlar sırasıyla ortalama %58,7 ve %74,4'tür (79). Yaygın tercih edilen tedavi rejimlerindeki değişiklikler, enfeksiyona yol açan klonların coğrafi dağılım farklılıkları ve dirence neden olan genlerin dağılımındaki farklılıklar gibi birçok faktöre bağlı olarak direnç oranları değişebilmektedir.

2.2.3.1. Aminoglikozit Grubu Antibiyotiklerin Genel Özellikleri

Aminoglikozitler *Actinomycetes* sınıfı bakterilerden ilk olarak 1940'lı yıllarda türetilmiş doğal ve yarı sentetik antimikrobiyal ajanlardır. Biyokimyasal açıdan yapıları incelenecek olursa temel olarak 4 farklı yapının türevi oldukları görülebilir. Bu 4 yapıdan 3'ü amino şekerlerle doyurulmuş aminosklitol 2-deoksistreptamin halkası (DOS) içerirken

streptomisinde bu halka yerine streptidin halkası mevcuttur. DOS içeren 3 grup ise yan zincirlerinin sayısı ve konumlarına göre biyokimyasal farklılıklar göstermektedir.

Amikasin, gentamisin ve tobramisin aminoglikozitler içinde en güçlü etkinliğe sahip ajanlardır. Aminoglikozitler etki spektrumları geniş ve bakterisidal antibiyotikler olup konsantrasyona bağlı etki gösterirler. *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. gibi gram negatif bakterilere; monoterapide tercih edilmemekle birlikte stafilokok, streptokok ve enterokoklar gibi bazı gram pozitiflere, *Brucella* spp., bazı *Mycobacterium* türleri ile *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* gibi bazı potansiyel biyoterörizm ajanlarına karşı etki gösterebilmektedirler.

Birçok klinik tabloda kullanımları olmakla birlikte; gram negatif bakterilerin neden olduğu ÜSE, pnömoni, batin enfeksiyonları, yara yeri enfeksiyonları ve sepsis gibi klinik tablolarda amikasin en güçlü klinik etkiyi göstermektedir. *P. aureginosa*'ya karşı en güçlü etkiye ise tobramisin sahiptir. Gentamisin ve streptomisin stafilokok, streptokok ve enterokoklar gibi gram pozitif bakterilerin neden olduğu sepsis, endokardit, ve menenjit gibi klinik tablolarda; ampisilin, vankomisin gibi beta-laktam/glikopeptit yapıdaki antibiyotiklerle sinerjistik etki göstermesi açısından önemli tedavi seçenekleridir (80).

Aminoglikozitler kuvvetli bazik yapıda moleküllerdir. Bu yapıları sayesinde bakteri hücresinin negatif yüklü yapılarına (gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit tabaka, gram pozitif bakterilerde teikoik asit vb.) bağlanır ve devamında elektron transport sisteminin sağladığı proton itici gücü sayesinde enerji bağımlı bir şekilde hücre içine alınır. Bu basamak birçok anaerob bakterinin aminoglikozitlere karşı gösterdiği intrinsek direnci açıklamaktadır. Sonrasında bakteriyel 30S rRNA'nın 16S alt biriminin A kısmına spesifik ve güçlü biçimde bağlanıp yapısında değişikliğe neden olarak protein sentezini kodon-antikodon etkileşiminde bozulma, etkileşim sonrası yanlış okuma ve translasyonun bozulması gibi birkaç farklı şekilde durdurur (80).

Aminoglikozitler kuvvetli bazik yapılarından ötürü polar bir özellik sergilerler ve bu vücutta sınırlı bir dağılıma sahip olmalarına neden olur. Sindirim kanalından emilimleri oldukça düşüktür. Plazma proteinlerine çok az (yaklaşık %10) bağlanırlar. Vücut zarları, plasenta ve kan-beyin bariyerinden az miktarda geçerler. Vücuttan başlıca glomerüler filtrasyonla değişmeden atılırlar; bu yüzden böbrek yetmezliği durumunda dozları ayarlanmalıdır. Uzun süren post antibiyotik etkilerinin olması (PAE), serum seviyeleri MİK değerinin altına

düştüğü zamanlarda bile bakteri üremesi üzerine durdurucu etki gösterdiği için doz aralığını uzatmaya imkan tanımaktadır (80).

Nefrotoksisite çoğunlukla geri dönüşümlü bir tablo olup tedavi boyunca gelişme insidansı %5 ile %15 gibi oranlarda değişebilmektedir. Nefrotoksisite yaşlı, daha önceden başka böbrek hastalığı olan, beraber başka nefrotoksik ilaç kullanan (furosemid, vankomisin vb.) hastalarda daha sık gözlenmektedir. Ototoksisite ise bir diğer önemli yan etki olup vestibülotoksisite (dengede bozulma) veya kokleotoksisite (işitmede bozulma) şeklinde kendini gösterebilir ve doza bağımlı olarak geri dönüşümsüz olabilir. Daha nadir görülen bir diğer yan etki ise kürar benzeri etki ile aminoglikozitlerin nöromusküler kavşakta blokaja neden olmalarıdır. Aminoglikozitlerin yan etkileriyle daha az karşılaşmak için tek doz kullanım, doz aralıkların uzatılması veya dozu azaltmak gibi stratejiler uygulanabilir. Tek doz kullanımın adaptif direnç geliştirebilecek alt popülasyonların seçimini engellemek ve en iyi Farmakokinetik/Farmakodinamik (FK/FD) parametrelere ulaşabilmek gibi başka avantajları da mevcuttur (80).

2.2.3.2. Dirençte Rol Oynayan Mekanizmalar

Bakterilerin aminoglikozitlere karşı geliştirdiği dirençte aminoglikozit modifiye edici enzimlerle (AME) ilacın kimyasal modifikasyonu, ilacın hedef bölgesinde metilasyon (16S RNA metil transferaz ile) veya kromozomal mutasyonlar aracılığıyla modifikasyon, eflüks pompaları veya membran geçirgenliğindeki değişiklikler gibi farklı mekanizmalar rol alabilmektedir. Bu bölümde daha önce değinilen düşük düzey intrinsik direnç konusuna değinilmeyecek, sadece yüksek düzey aminoglikozid direncine yol açan mekanizmalar irdelenecektir.

P. aereginosa ve *Acinetobacter* spp. gibi birçok gram negatif bakteride AME'lerle birlikte MexXY-OprM gibi RND ("resistance nodulation division") eflüks sistemlerindeki mutasyonlar sonucu ilacın aşırı dışa atımı dirençte önemli rol oynamaktadır. Daha nadir gözlenen bir diğer yol da porin mutasyonları sonucu oluşan geçirgenlik azalışıdır (80). Enterokoklarda ise düşük düzey dirençten temel olarak azalmış hücre duvarı geçirgenliği sorumluyken yüksek düzey dirençte bakterinin horizontal olarak kazandığı birtakım genlerin kodladığı AME'ler esas rolü oynamaktadır. Bu kazanımda plazmitler ve transpozonlar gibi birçok mobil genetik elemanın rol aldığı tespit edilmiştir (81). Genlerin kodladığı farklı enzimler farklı substratlara karşı farklı etkinlik seviyeleri göstermektedir; örneğin bir enzim amikasin ve gentamisinini daha fazla inaktivite ederken bir başka enzim streptomisine karşı

daha etkin olabilmektedir. Bu hususta akılda tutulması gereken önemli bir diğer nokta da bu mobil genetik elemanların eş zamanlı olarak başka direnç veya virülans genlerini de birlikte taşıyabildiği ve buna bağlı çoklu ilaca dirençli (ÇİD) mikroorganizmaların oluşumuna neden olabildikleridir (81).

AME'ler aminoglikozitleri inaktive etme yollarına bağlı olarak 3 farklı sınıfta incelenebilirler; asetilleyerek inaktive edenler (asetiltransferazlar; AAC), adenilleyerek inaktive edenler (nükleotidiltransferazlar; ANT) ve fosforilleyerek inaktive edenler (fosfotransferazlar; APH). Bu genleri isimlendirme de kullanılan yöntem ile; AAC, ANT veya APH ile enzimatik modifikasyonun tipini; (1), (3), (9) veya (2') ifadeleriyle ilaçta modifiye edilen kimyasal zinciri; I, II, III gibi roma rakamlarıyla farklı direnç profillerini ve a,b,c şeklindeki harflerle ise farklı proteinleri ifade etmek mümkündür. Örnek vermek gerekirse AAC(6')-Ia ve AAC(6')-Ib aynı hedef bölgesini hedefleyen, aynı direnç profiline, aynı enzimatik yolakla sebep olan iki farklı proteindir (81).

Asetilasyon yolu ile aminoglikozit inaktivasyonu yapan AME'ler aminoglikozitlerin etkin oldukları amino gruplarına göre 4 sınıfa ayrılırlar; (1), (3), (6') ve (2'). Bu sayılar bahsi geçen amino gruplarının konumunu ifade etmektedir. AAC(1) grubu apramisin gibi bazı aminoglikozitlere dirençte önemli bulunmakla beraber enterokoklarda ki yüksek düzey aminoglikozit direncinde (YDAD) önemli bir role sahip değildir. AAC(3) grubu en az 5 farklı direnç paternine sahip olup özellikle gram negatif bakterilerin aminoglikozitlere karşı direncinde önemli rol oynarken enterokoklar için YDAD'de ise yine pek sık rastlanan bir grup değildir. AAC(6') grubu ise asetilasyon yoluyla inaktivasyon yapan enzimler arasında enterokoklar açısından en sık rastlanan ve YDAD'de en önemli rolü oynayan gruptur. AAC(6')-I gentamisin, amikasin, tobramisin gibi güçlü birçok aminoglikozit üzerine etkin olan bir paterne sahip olup bu paterne neden olan en az 6 gen (AAC(6')-Ia ile If arası) bilinmektedir. Bu grup içinde enterokokların YDAD'sinde en sık gözlenen AAC(6')-Ie, bifonksiyonel olan ve sadece gram pozitif bakterilerde bulunabilen bir enzim olan AAC(6')+APH(2'') enziminin amino terminalini kodlar. Önemli bir nokta YDGD'de en sık rastlanan enzimin bu enzim olmasına rağmen YDSD'de pek bir öneminin olmamasıdır (80, 81, 82).

Fosforilasyon enzimleri ATP'den aldıkları fosfat grubunu aminoglikozitlerin hidroksil gruplarına ekleyerek inaktivasyona yol açan enzimler olup hedefledikleri kısımlara göre 7 alt sınıfa ((2''), (3''), (3') (4), (6), (7''), ve (9) olarak) ayrılmaktadırlar. Bu yolla etki eden

birçok enzim klinik açıdan önemli olan aminoglikozitlere karşı dirençte önemli rol oynamamakla birlikte bazıları gram negatif bazıları ise gram pozitif bakterilerde amikasin, gentamisin, tobramisin ve streptomisin gibi önemli aminoglikozitlere karşı dirençten sorumludurlar. Enterokoklarda *APH(2'')- Ia*, *APH(2'')- Ib*, *APH(2'')- Ic*, *APH(2'')- Id*, *APH(3'')- Ia* ve *APH(3'')- Ib* genlerinin kodladığı enzimler dirençte önemlidir. *APH(2'')- Ia* geni bifonksiyonel enzim olan AAC(6')+APH(2'') enzimini kodlayan genlerden diğeridir ve bu enzim streptomisin hariç, YDGD başta olmak üzere geniş spektrumlu birçok aminoglikozite karşı dirençte en önemli ve en sık karşılaşılan enzimdir. *APH(2'')- Ib*, *APH(2'')- Ic* ve *APH(2'')- Id* YDGD ile ilişkili olan fakat YDSD'de önemi olmayan enzimler olup prevalansları bölgeden bölgeye değişiklikler göstermektedir. *APH(3'')- I* ise streptomisine olan dirençte önemli olan fakat gentamisin direncinde önemi belirgin olmayan bir enzimdir (81, 83).

Adenilasyon enzimleri ATP'den aldıkları AMP grubunu aminoglikozit moleküllerinin hidroksil gruplarına ekleyerek inaktivasyona yol açarlar. ANT(2''), (3''), (4'), (6) ve (9) şeklinde 5 alt sınıfı vardır. ANT (3'')- Ia ve ANT (6)- Ia enzimleri enterokoklarda YDSD'de önemli olan enzimlerdir. İlacın kendinin değil hedef bölgesi olan 16S rRNA'nın nükleotid rezidülerinin metillenmesine neden olarak ilacın bağlanmasını inhibe eden 16S rRNA metiltransferaz enzimi ise ağırlıklı olarak gram negatif bakterilerin direncinde önemli olarak görülürken bazı çalışmalarda bu enzimin *E. faecium*'un aminoglikozitlere olan düşük düzey intrinsek direncinde rol sahibi olabileceği belirtilmiştir (81, 82, 83).

2.2.3.3. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklerle Sinerji

Beta-laktam yapıdaki antimikrobiyaller hücre duvarının esansiyel yapılarından biri olan peptidoglikan tabakanın oluşturulması ve yeniden yapımında peptit zincirdeki çapraz bağların oluşumunda görevli olan PBP'lere bağlanarak transpeptidasyon gibi reaksiyonları inhibe eder. Beta-laktam ajanlarla aminoglikozitler arasındaki sinerji temel olarak beta-laktamların hücre duvarı üzerine oluşturdukları inhibitör etki sonucu aminoglikozitlerin artmış hücre içine alımı ve tek başına kullanımda ulaştığı konsantrasyonlardan kat ve kat daha yüksek hücre içi konsantrasyonlara ulaşabilmesinden kaynaklanır. Peptidoglikan tabakanın (D-ala-D-ala) peptit prekürsörlerine bağlanarak hücre duvarı sentezini etkileyen vankomisin gibi glikopeptitlerle de benzer sebeplerle sinerji gelişmektedir (84). Eğer enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozit direncine neden olan AME'ler mevcut değilse

monoterapide etkin olmayan aminoglikozitler; beta-laktam ajanlar ve glikopeptitlerle oluşan sinerji nedeniyle birlikte başarıyla kullanılabilir.

Aralarındaki güçlü sinerjistik etki uzun yıllardır bilinen aminoglikozit ve beta-laktam kombinasyonu enterokokların neden olduğu çok çeşitli klinik durumda başarıyla kullanılmaktadır. Bu alanlardan en önemlisi EE ve bakteriyemi tablolarıdır. Doğal veya protez kalp kapakçığı olmasına, relaps görülmesine veya tedavi yanıtına göre değişmekle birlikte en az 4 hafta süren ampicilin + gentamisin (ampicilin 2g IV q4h + gentamisin 1 mg/kg q8h) kombinasyon terapisi YDGD gözlenmeyen hastalarda sıkça tercih edilmektedir (84). Ampicilin direnci durumunda vankomisin; YDGD durumunda ise YDSD durumu değerlendirilmelidir. Bazı izolatlar YDGD direnci gösterirken YDSD göstermemektedirler; fakat YDGD gösteren izolatların amikasin, tobramisin, kanamisin gibi antibiyotiklere karşı da dirençli olduğu unutulmamalıdır.

Dozlar ve tedavi süreleri değişebilmekle birlikte enterokoklara karşı bu kombinasyonların kullanılabildiği diğer klinik durumlar ise kritik hastalık/ sepsis tablosu, menenjit gibi santral sinir sistemi enfeksiyonları (hasta uygunsa tercihen 2 tane hücre duvarına etkin ajanla birlikte gentamisin olmak üzere) ve diğer ilaçlara dirençli komplike üriner sistem enfeksiyonları olarak sayılabilir. Tüm bu tedavi rejimleri sırasında en önemli problemlerden biri toksisitedir. Hem vankomisin hem de aminoglikozitlerin nefrotoksisite ve ototoksisite gibi ortak toksisite tablolarına birlikte kullanımda daha fazla sebep olmaları ve her iki grup ilacın da terapötik indekslerinin dar olması tedavide sınırlayıcı faktörlerdendir (84).

2.2.4. *Enterococcus* Türlerinde Glikopeptit Direnci

Enterokokların daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi birçok tedavi ajanına karşı intrinsek veya kazanılmış direnç göstermelerinden ötürü glikopeptit yapıdaki antibiyotikler enterokoklara bağlı çeşitli enfeksiyonların tedavisinde en önemli tedavi ajanlarından biri olma özelliğini korumaktadırlar. Bu antibiyotiklerin yıllar içindeki yaygın ve kontrolsüz kullanımı direnç gelişiminde önemli rol oynamıştır. Özellikle sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlardaki artmış VRE insidansı DSÖ'nün 2017 yılında vankomisin dirençli *E. faecium*'u yüksek öncelikli patojenler listesine dahil etmesine neden olmuştur.

Vankomisin ve teikoplanin kullanımda olan glikopeptit yapıdaki antibiyotiklerdir. Bunlara karşı gelişen direnç oranları bölgeden bölgeye ve türden türe değişiklikler göstermektedir. Enfeksiyona yol açan klonların farklılığı, dirençte rol oynayan genleri taşıyan mobil genetik elemanların dağılımı, yaygın ve kontrolsüz glikopeptit kullanımı, hayvan endüstrisinde

avoparsin kullanımı ve enfeksiyon kontrol uygulamalarındaki farklılıklar gibi birçok faktör de bölgesel olarak VRE insidansında çeşitliliklere yol açmaktadır. Global olarak değerlendirildiğinde en yüksek vankomisin direnç oranları Amerika’da (Kuzey Amerika ve Latin Amerika) gözlenmekte iken bunu ülkemiz ve İran, Irak, Suudi Arabistan, Kuveyt gibi ülkelerin dahil olduğu Batı Asya ülkeleri takip etmekte; en düşük direnç oranları ise genel olarak Kuzey Avrupa ve Güney Doğu Asya ülkelerinde gözlenmektedir. Asya ülkelerinde yapılan toplam 11.875 enterokok izolatını içeren 39 çalışmayı derleyen bir meta analiz çalışmasında bölgeden bölgeye oranlar değişmekle birlikte VRE oranı %8,1 olarak tespit edilirken direnç tür düzeyinde incelendiğinde *E. faecium*’da %22,4 ve *E. faecalis*’te %3,7 olarak gözlenmiştir (85). CAESAR 2019 Türkiye verilerine göre kan ve beyin omurilik sıvısından elde edilen *E. faecalis* izolatlarının %1’i vankomisine dirençli iken bu oran *E. faecium* için %13 olarak gözlenmiştir.

Önemli bir nokta vankomisin direncini tespit etmede kullanılan yöntemlerdir. Otomatize sistemlerle düşük/orta düzey vankomisin direncinin tespitinde (özellikle vanB tipi dirençte) başarısızlıkların olduğu özellikle göz önünde tutulmalıdır. EUCAST direncin tanımlanmasında standart disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanımını önermektedir. CLSI’ da da aynı inkübasyon, besiyeri ve değerlendirme ölçütleri önerilirken zon çapları ve sınır değerleri EUCAST’ten farklılıklar göstermektedir (77).

2.2.4.1. Glikopeptit Grubu Antibiyotiklerin Genel Özellikleri

Glikopeptit grubu antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplaninin yanı sıra bunların daha yeni geliştirilmiş yarı sentetik türevleri olan ve lipoglikopeptitler olarak adlandırılan dalbavansin, telavansin ve oritavansin gibi antibiyotikler gram pozitif bakterilerin neden olduğu birçok enfeksiyonda önemli tedavi ajanlarıdır. Vankomisin 1950’li yıllarda keşfedilen; *Streptomyces orientalis* tarafından sentezlenen, glikolize haldeki trisiklik heptapeptit kor yapısına sahip oldukça büyük moleküllü bir antibiyotiktir. Teikoplanin ise *Actinoplanes teichomyceticus* tarafından sentezlenen, vankomisinden farklı olarak tetrasiklik heptapeptit yapıda bir kor yapısı ile uzun yağ asidi yan zincirlerine sahip olan bir glikopeptittir. Bu uzun yağ asidi zincirleri teikoplanini daha lipofilik hale getirdiği için daha iyi doku dağılımı, daha uzun yarı ömür ve daha düşük toksisite gibi bazı avantajlar sağlamaktadır. Her iki antibiyotikte de asıl antimikrobiyal etkiden heptapeptit yapıdaki kor yapı sorumludur (86).

Glikopeptitler hücre duvarının henüz çapraz bağ yapmamış penta peptit öncüllerinin D-Ala-D-Ala terminaline bağlanarak çapraz bağlanma için gerekli olan transpeptidaz/transglikozilaz enzim aktivitesini bloke etmek suretiyle hücre duvarının sentezini bozarlar ve bu sayede bakterisidal bir etki gösterirler. Etki spektrumları gram pozitif bakteriler içinde oldukça genişken; büyük moleküllü ve hidrofobik yapıları gram negatif bakterilerin hücre duvarlarına ulaşımını engellediğinden, gram negatiflerde intrinsek direnç neden olur. Gram pozitif bakterilerden ise *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Erysipelothrix* spp. ve *E. casseliflavus* ile *E. gallinarum* vankomisine karşı intrinsek direnç göstermektedirler.

Kullanımının önemli olduğu birçok endikasyon olmakla birlikte özellikle metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve enterokokların neden olduğu endokardit, sepsis, deri-yumuşak doku enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları kullanım alanlarının başını çekmektedir. Tüm bu endikasyonlarda vankomisin intravenöz (İV) kullanılırken *Clostridium difficile*’ye bağlı enterokolitte ise oral yolla kullanılmaktadır. Teikoplaninin ise intramüsküler (İM) uygulanan formu da mevcuttur (86). BOS geçişi zayıf olsa da gerekli durumlarda gram pozitif bakterilere bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonlarında intratekal veya şant içine verilerek kullanılabilirler.

Vankomisin oral emilimi oldukça az olan ve %80-90’dan fazlası böbrekten değişmeden atılan, hidrofobik ve doku dağılımı zayıf olduğu için yarı ömrü de kısa olan, terapötik aralığı oldukça dar bir antibiyotiktir. Glikopeptitler hem konsantrasyona hem de zamana bağlı etki gösteren antibiyotikler olup aminoglikozitler kadar etkin olmasa da post antibiyotik etki gösterme özelliğine de sahiptirler. Birçok toksik yan etkileri mevcuttur. Bunlardan bazıları; nefrotoksisite, ototoksisite, hipersensitivite sendromları, enjeksiyon yerinde flebit gelişimi ve “kırmızı adam sendromu” gibidir. Nefrotoksisite ve ototoksisite yan etkileri aminoglikozitler gibi benzer yan etkilere sahip olan ilaçlarla birlikte alındığında daha belirgin olmaktadır. Kırmızı adam sendromu ilacın hızlı infüzyonu sonucu mast hücreleri üzerindeki direkt histamin deşarjı yapıcı etkisine bağlı gelişen hipotansiyon, taşikardi ve flushingle seyreden klinik tablo olup bunu önlemek için infüzyon süresinin uzatılması gerekmektedir. Hem terapötik aralığın dar olması hem de tedavi etkinliğinin takibi için ilacın serum konsantrasyonunun sıkı takibi önemlidir. Teikoplanin ise daha güvenilir olması, İM kullanılabilmesi ve daha başarılı FK/FD özellikleri gibi avantajlara sahip olmasına rağmen çoğu durumda vankomisin kadar potent değildir (86).

2.2.4.2. Dirençte Rol Oynayan Mekanizmalar

Enterokoklarda özellikle de *E. faecium*'da glikopeptit direnci oldukça önemli bir problemdir. Vankomisine direnç açısından önemli olan bir diğer bakteri de *S. aureus*'tur. MRSA enfeksiyonlarında yıllarca direnç gelişmeksizin kullanılan vankomisine karşı gelişen seçilim baskısı “heterojen olarak vankomisine orta duyarlı *S. aureus*” (hVISA), “vankomisine orta duyarlı *S. aureus*” (VISA) ve “vankomisine dirençli *S. aureus*” (VRSA) olmak üzere 3 farklı direnç profilinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Ülkemizde diğer ikisine dair vakalar bildirilmiş olmakla birlikte VRSA olgusu henüz hiç bildirilmemiştir.

hVISA ve VISA gelişiminde rol oynayan mekanizmalar VRSA gelişimindeki mekanizmalar kadar net olmamakla birlikte; en muhtemel yol ilacın ortamdaki varlığında bakteri alt popülasyonlarında gelişen çeşitli mutasyonların birikimi sonrası duyarlılıkta azalma olması şeklindedir. Bu iki fenotipe sebep olan mutasyonlar genelde *VraSR* ve *GraSR* gibi regülasyon sistemlerinde meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar daha kalın ama daha az çapraz bağ içeren, serbest halde daha fazla D-Ala-D-Ala rezidüsü bulunduran peptidoglikan tabakalarına neden olur. Bu serbest rezidüler glikopeptit moleküllerinin hücre duvarı sentezi inhibisyonu yapmak için asıl bağlanması gereken rezidüler yerine bağlanmak için sahte hedefler görevi görürler. VRSA'da ise direnç VRE'lerin konjugatif plazmidinden köken alan *Tn1546*'daki *vanA* operonunun horizontal olarak *S. aureus*'a aktarılması sonucu gelişir ve nadirdir (87).

Dünya'da ilk kez 1988'de, ülkemizde ise ilk kez 2001 yılında VRE olgularının bildirilmesinden sonra, bu direncin kazanılmasında rol alan mobil genetik elemanların yaygın mevcudiyeti ciddi ve hızlı bir prevalans artışına neden olmuştur. Direnç *vanA*'dan *vanN*'ye kadar ifade edilen birçok farklı fenotipte ifade edilmesine rağmen en sık *vanA* ve *vanB* tipi dirençle karşılaşmaktadır. Bu farklı fenotiplerin hemen hepsinde ortamda glikopeptit gibi bir uyarıcının varlığında oluşturulan enzimlerin, glikopeptitlerin yüksek afinite ile bağlandığı D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Lak veya D-Ala-D-Ser gibi daha zayıf bağlanmaya ve dirence neden olacak bir rezidü sentezine yol açtığı gözlenir. Bu fenotiplerin bazısında teikoplanine, bazısında vankomisine daha yüksek direnç görülürken yine fenotipten fenotipe ilaç varlığında indüklenme ve direnç geni lokasyonu gibi faktörler de değişiklikler göstermektedir (88).

vanA tipi direnç plazmit DNA'sına entegre olmuş olan *Tn1546* transpozonu üzerinde yerleşen 7 farklı genden oluşan *vanA* gen kümesinin neden olduğu bir direnç profilidir. Bu profil enterokoklar arasında en yaygın görülen glikopeptit direnç profili olup (özellikle

E. faecium ve *E. faecalis*'te) hem vankomisin hem de teikoplanine karşı yüksek düzey ve indüklenebilir bir direnç gözlenmektedir. Bahsedilen gen kümesinin ürünü olan rezidü ise D-Ala-D-Lak'tır. Daha öncede bahsedildiği gibi VRSA oluşumuna da bu transpozonun ve operonun ediliminin neden olduğu gözlenmiştir (88).

vanB tipi direnç ise Tn1547 transpozonu üzerinde kodlu bulunan *vanB* gen kümesi aracılı olup direnç genleri vanA'nın aksine çoğunlukla kromozom üzerinde (bazen plazmit) yerleşmiş olup konjugasyonla transfer edilir. *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin glikopeptit direncinde önemli olan indüklenebilir ve vanA gibi kazanılmış dirence neden olan bu fenotip vankomisine orta düzey dirence yol açarken, bu fenotipe sahip bakteriler çoğunlukla teikoplanine duyarlıdır. Otomatize sistemlerle duyarlılık sonucu verildiğinde en fazla hatalı sonuç gözlenen fenotipin bu fenotip olduğu da unutulmamalıdır. Bu fenotipe yol açan gen kümesinin ürünü olan rezidü de yine D-Ala-D-Lak'tır (88).

vanC tipi direnç, bahsedilen fenotipler içinde intrensek dirence yol açan tek fenotip olması açısından önemlidir. İndüklenemez ve aktarılamaz bir fenotip olması nedeniyle enfeksiyon kontrol önlemi alınması ihtiyacı olmayan bu fenotipte dirence yol açan genler kromozomal olarak yerleşmiştir ve ürünleri D-Ala-D-Ser'dir. Bu fenotiple *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. flavescens*'te karşılaşıp vankomisine düşük düzey direnç görülürken teikoplanine karşı ise direnç gözlenmez. Son olarak daha az rastlanan vanD fenotipine ise *E. faecium*' da rastlanır. İndüklenebilir ve kazanılmış bir dirence yol açan bu fenotipte direnç genleri kromozomda yerleşmiş olup orta düzey vankomisin ve düşük düzey teikoplanin direnci gözlenir. van D fenotipinde de gen ürünü vanA ve vanB'de olduğu gibi D-Ala-D-Lak'tır (88).

2.2.4.3. Enterokoklarda Vankomisin Direncinin Taranması ve Sürveyans

Enterokoklar başta bağırsak florası olmak üzere normal vücut florasında yaygın olarak bulunan, insanlar ve çiftlik ve kümes hayvanları gibi birçok konağı kolonize edebilen bakterilerdir. VRE kolonizasyonu en sık olarak GİS'te gözlenirken önemli bir nokta bu bakterilerin cansız yüzeylerde ve birçok olumsuz çevre şartında canlılıklarını sürdürebilmesidir. VRE kolonizasyonu belirli bazı durumlarda (kanseri, transplantasyon vb immünsüpresif durumlar) septisemi gibi ağır klinik tablolar gelişmesi açısından önemli bir risk faktörüdür. Konunun bir diğer önemli boyutu bu kolonizasyon ve taşıyıcılığın hastane salgınlarına yol açabilmesidir.

Yapılan çalışmalarda Avrupa ve Amerika arasında sağlıklı insanlarda asemptomatik VRE taşıyıcılığı ve enfeksiyonları oranları arasında bazı farklılıklar mevcuttur. Taşıyıcılık oranları Avrupa ülkelerinde daha yüksekken enfeksiyon oranları Amerika'da daha yüksektir. Avrupa'da taşıyıcılıktaki yüksekliğin en önemli nedeninin hayvan endüstrisindeki yaygın avoparsin (vankomisin türevi) kullanımı ile hindi, tavuk, domuz ve dana gibi hayvanlarla yakın temasın yüksekliği kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Sağlıklı insanlarda kolonizasyona neden olan izolatlarla, yakın temasta bulundukları çiftlik ve kümes hayvanlarından elde edilen izolatların aynı genetik paternleri paylaşmaları bu hipotezi desteklemiştir. Amerika'da hayvan endüstrisinde avoparsin kullanımının yaygın olmaması ise daha düşük asemptomatik taşıyıcılık oranlarıyla sonuçlanırken; enfeksiyonlarda daha yaygın vankomisin kullanımı ve nozokomiyal izolatların Avrupa'dakinden daha farklı, dirençli bir genetik soydan gelmesi daha yüksek VRE enfeksiyon oranlarıyla sonuçlanmıştır (89).

VRE ile kolonizasyon süresi 7 haftadan 3 yıla kadar değişen sürelerde olabilir. Yayılım kolonize veya enfekte kişilerle direkt temas yoluyla olabileceği gibi sağlık çalışanlarının elleri veya kontamine hastane ekipmanları-yüzeyleriyle indirekt temas yoluyla da gerçekleşebilir. Uzamış hastane yatışı, sefalosporin ve diğer geniş spektrumlu antimikrobiyallerin yaygın kullanımı, steroid benzeri immünsüpresif ilaçların kullanımı ve intraabdominal cerrahi yapılmış olması da kolonizasyon ve yayılım riskini artıran diğer faktörlerdendir. “CDC Hastane Enfeksiyon Kontrol Uygulamaları Danışma Komitesi” (HICPAC) yayılımı önlemede vankomisin kullanımının sınırlandırılmasını, hastane personelinin sürekli eğitimlerini (el yıkama vb), VRE'li hasta ve taşıyıcıyla temas izolasyonunu, klinik izolatların rutin olarak vankomisin direnci açısından değerlendirilmesini, antimikrobiyal sürveyans çalışmalarının yapılmasını (özellikle yüksek riskli hastalardan) ve VRE kolonizasyon-enfeksiyon riski yüksek hastalardan periyodik olarak dışkı ve rektal sürüntü örneklerinin alınmasını önermektedir (89).

VRE açısından dışkı veya rektal sürüntü örneklerinin taranması hususunda EUCAST ve CLSI aynı yöntemleri önermiş fakat yöntemleri farklı isimlendirmişlerdir. EUCAST'te sınır değer agar; CLSI'da ise agar dilüsyon yöntemi olarak isimlendirilen bu yöntemde 6 mg/L vankomisin içeren Brain-Heart İnfüzyon Agar'a (BHI) 1-10 µl 0.5 McFarland bakteri inoküle edilip $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de aerobik ortamda 24 saat inkübe edilir. Sonrasında yapılan değerlendirmede besiyeri üzerinde >1 enterokok kolonisi varlığı dirence işaret eder. Bu yöntem vanA ve vanB pozitif izolatları tespit etmede başarılı bulunmuştur. Moleküler

yöntemlerle dirence neden olan genlerin tespiti de tarama amaçlı kullanılabilmektedir (77, 90).

2.3. *Enterococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşumu

Biyofilm çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere bağlanan; hidrate bir matriksle çevrili proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitler gibi substratların bulunduğu mikroorganizma ve matriks hücre popülasyonudur. Ayrıca biyofilm, mikroorganizmaların kendilerini çevresel faktörlerden (immün sistem ve antimikrobiyaller gibi) korumak ve besin kaynağını daha efektif kullanmak için oluşturdukları mikro ekosistemlerdir. Biyofilm oluşumu çeşitli aşamaların birbirini takip ettiği kompleks bir süreçtir. Bu aşamalar (her biri her zaman gözlenmemekle birlikte) sırasıyla; yüzeye tutunma ve yüzeyin hareketsizleştirilmesi, hücre-hücre etkileşimi, mikrokoloni oluşumu ve kompleks biyofilm formasyonu oluşumu şeklindedir (4).

Biyofilm formasyonu içindeki bakteriler, formasyon dışındaki serbest formlardan daha farklı davranışlar sergilerler. Temel olarak hücre popülasyonu yoğunluğu ve besin maddeleri gibi çevre faktörlerine yanıt olarak bakteriyel gen ifadesinin düzenlenmesi, quorum sensing olarak adlandırılan sistemin hücre dışı sinyal moleküllerini -otoindüktörler- üretmesi yoluyla gerçekleştirilir. Biyofilm formasyonunun üretimi ve düzenlenmesinde birçok bakteride bu sistemin önemli rol aldığı gözlenmiştir.

Biyofilm oluşumu birçok farklı mikroorganizmaya bağlı enfeksiyonlarda önem arz etmektedir. Enterokoklar; *Pseudomonas aureginosa*, *S. aureus* ve *Candida* spp. gibi mikroorganizmalara benzer şekilde sıkça biyofilm oluşturan ve oluşturduğu biyofilm formasyonu enfeksiyonlarında önemli olan mikroorganizmalardandır. Bazı enfeksiyonlarda daha sık olarak ve klinik açıdan daha önemli biyofilm oluşumuna rastlanmaktadır. Bunlar özellikle kateter, protez tıbbi materyal, stent, kalp pili vb medikal cihazların kullanımına bağlı gelişen enfeksiyonlar ile EE ve üriner sistem enfeksiyonlarıdır.

Biyofilm formasyonu temel olarak hücre dışı polimerik madde (HDPM) içine yerleşmiş olan mikroorganizmal hücrelerden oluşmaktadır. HDPM çok farklı kimyasal ve fiziksel komponentler içerebilmekle birlikte yapının temel komponenti polisakkaritlerdir. Çoğunlukla gram negatif bakterilerin oluşturduğu biyofilm formasyonlarında nötral ya da polianyonik yapıda ve gram pozitif bakterilerin oluşturduğu biyofilm formasyonlarında ise katyonik yapıda polisakkarit yapısına rastlanırken; enterokoklar gram pozitif bakteriler olmasına rağmen polisakkarit yapının anyonik yapıda olduğu elektron mikroskopu

çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bu anyonik yapının iki değerlikli kalsiyum ve magnezyum gibi katyonların geçişine izin vermesi bunların polimer dizileri arasında çapraz bağlar yaparak gelişen biyofilm formasyonlarında çok daha güçlü bir bağlanma kuvveti yaratmasına imkan tanımaktadır (91, 92).

HDPM, yapısına hidrojen bağlayabilme özelliği sayesinde oldukça hidrate (%90) bir yapıdır ve çoğunlukla yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik kısımlar mevcuttur. Bu hidrate yapı, içerisindeki mikroorganizmalara kuruluğa karşı direnç sağlar. Biyofilmlerin yapısı genelde tek düzelik göstermez. Yapının sertliğini veya formasyon değişikliği gösterebilmesini ve suda çözünülebilirliğini belirleyen en temel faktör, HDPM'nin polisakkarit yapısının iskeletini oluşturan biyokimyasal yapı ve bunların arasındaki bağların çeşitleridir. HDPM tabakasını oluşturan diğer bazı moleküller ise çeşitli iyonlar, proteinler, lipitler ve nükleik asitlerdir. Biyofilm yapısındaki bir diğer önemli yapı da matriks içindeki hücrelere metabolizmaları için gerekli besin maddelerini taşıyan heterojen yapıdaki kanallardır (91,92).

Biyofilm oluşumunun başlangıç evresinde yüzeye tutunma önemli bir aşamadır ve bu tutunma biyotik veya abiyotik yüzeylere olabilir. Biyofilm oluşumuna ve hücre tutunmasına imkan tanımayan bir yüzey henüz tespit edilememiş olsa da in vivo olarak hasarlı epitel-endotel içeren yüzeyler veya öncesinde başka mikroorganizmalarla kolonize yüzeyler ile hidrofobik ve pürüzlü yüzeyler tutunmanın daha kolay olduğu alanlardır. Biyofilm oluşum aşamaları kabaca 3 aşamada incelenebilir. İlk aşamada yüzeyle ilk temas ve gevşek tutunma olarak adlandırılacak olay gerçekleşir. Bu basamak pelikül olarak adlandırılan ve tutunmaya imkan tanıyan ince tabakanın oluşumuyla başlar. Basamağın gelişiminde hidrofobik etkileşimler ve elektrostatik bağlar gibi zayıf kimyasal bağlar rol oynarlar. Önemli bir nokta bu basamağın geri dönüşümlü olmasıdır. Biyolojik sistemlerde bu basamakta formasyona müdahale edilmesinin ileri formasyon oluşumunu önlemeye imkan tanıdığı gösterilmiştir. Mikroorganizmalar ise bu basamağın geri dönüşlü olması sayesinde tutunmayı arzuladığı yüzeyde yeterli besin ve suyun olup olmadığını quorum sensing sistemleri sayesinde algılayıp biyofilm oluşumu için bir sonraki basamağa geçme veya planktonik yaşamayı seçme şansı bulmaktadır (92, 93).

Oluşumda bir sonraki basamak geri dönüşümsüz tutunma, büyüme ve hücrelerin yüksek c-di-GMP varlığında etkileşerek mikrokoloni oluşturmalarıdır. Bu basamakta tutunmasını tamamlayan mikroorganizmalar bölünüp mikrokolonileri oluşturur, HDPM yapısına diğer

planktonik mikroorganizmaları ve hücreleri bağlar ve tüm bunların HDPM içinde gömülü halde ve birbirleriyle etkileşimlerini sürdürecektir şekilde yaşamalarına olanak tanır. Güncel bilgi geçmişte bilinenin aksine bu bölünme ve HDPM içine paketlenme sırasında homojen sıkı tabakalar halinde dizilimin olmadığı ve heterojen-hücreler arası boşluklar içeren “mantar” veya “kule” olarak tanımlanan bir yapının olduğudur. Bu boşluklar besin maddelerinin difüzyonuna ve oluşan metabolik atıkların uzaklaştırılmasına olanak tanır. Olgun bir biyofilm üç katmandan oluşur; iç katman biyofilmin iç dengesi ve düzenlenmesini sağlayan katman iken, orta katman mikroorganizmaların çoğunu barındıran esas katmandır. Dış katman ise biyofilmden ayrılmaya hazır planktonik mikroorganizmaları barındırır (93, 94).

Oluşumdaki son basamak ise dağılma basamağı olup bu basamakta biyofilmi oluşturan tek mikroorganizma hücreleri kopabileceği gibi mikroorganizma kümeleri de formasyonu terk edip farklı bölgelerde kolonize olabilirler. Olgun biyofilmin dağılmasından sorumlu olan bazı aktif ve pasif yollar mevcuttur. Aktif olarak, HDPM’ nin parçalanması sonucu dağılma örnek verilebilir. Pasif olarak ise birçok sebep mevcuttur. Bunlar; formasyon içindeki mikroorganizmaların aşırı çoğalması sonucu yer ve besin için rekabet oluşturmaları, sıcaklık-metabolik artık birikimi ve oksijen kısıtlılığı gibi çevresel faktörler ile HDPM yapımını uyanan genlerde azalmış-HDPM yıkımını uyanan genlerde ise artmış ekspresyon gibidir (93, 94).

Hakkında daha fazla çalışma yapıldığı için biyofilm oluşum basamakları ve bunda rol alan mekanizmaların ayrıntılı olarak tanımlandığı *S. aureus* ve *P. aureginosa*’nın aksine enterokokların biyofilm formasyonu hakkındaki bilgiler görece daha sınırlıdır. Başlangıç aşamasındaki geri dönüşümlü zayıf tutunma basamağı bakterilerin hareketli veya hareketsiz olmalarına göre farklılık gösteren bazı faktörlerle ilişkilidir. Örneğin hareketli bir bakteri olan *P. aureginosa*’da başlangıç tutunması bakterinin kamçı ve pilus yapıları aracılığıyla gerçekleşirken hareketsiz bir bakteri olan *S. aureus*’ta ise bu basamakta yüzey adezinleri rol oynar. *E. faecium* ve *E. faecalis* ise hareketsiz bakteriler olmalarına karşın bu basamakta yüzey adezinleri ile birlikte piluslarından da faydalanırlar. Bu yüzey adezinleri ve piluslar içinde en sık bulunan ve en önemli oldukları düşünülenler Ebp (Endokardit ve biyofilm ilişkili pilus), Agg (Agregasyon faktörü), Esp (Enterokokal yüzey proteini), PilA ve PilB (Pilus A ve Pilus B) şeklindedir (95).

Daha önceki çalışmalarda Ebp proteinini kodlayan *ebp* gen bölgesinin enterokoklara has ve yüksek oranda korunmuş bir bölge olduğu düşünülürken *ebpC* bölgesinin homoloğu olan bir bölgeye *S. aureus* bakterisinde rastlanmış ve bu bölgenin fibronektin bağlayan proteini, dolayısıyla adezyonla ilişkili bir proteini kodladığı gösterilmiştir. Yapılan transkriptomik çalışmaların ışığında sadece bu gen bölgesinde değil enterokoklarda biyofilm oluşumunda rol alan birçok gen bölgesinde ESKAPE patojenleri ile homologluklar olduğu gösterilmiştir.

Agg' nin ise ayrıca feromon tabanlı sinyal ileti yollarında plazmitlerin konjugasyonunu da kolaylaştırdığı gözlenilmiştir. pilA ve pilB ise başlangıç adezyonunda önemli roller alan tip 4 pilus sistemini kodlayan genetik sistemin bir parçasıdır (20, 95). Esp başlangıç adezyonunda kollajene bağlanan ve esansiyel rol oynayan bir proteindir. Bu proteini kodlayan *esp* gen bölgesinin, bir patojenite adasında, virülansta önemli rolleri olan birçok genle birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Esp' nin asidik ortamlarda kümelenerek amiloid benzeri bir formasyon aldığı ve biyofilm matriksinin sertliğinde önemli katkısı olduğu düşünülmektedir. (27).

Başlangıçtaki zayıf tutunma basamağından mikrokoloni oluşturma ve bölünme aracılı olgun biyofilm oluşturma aşamasına geçişte *epa* genleri (enterokokal polisakkarit antijen) en önemli rolü oynar. Bu gen kümesinin şimdiye kadar tespit edildiği kadarıyla 16 farklı genden oluştuğu ve birçoğunun polisakkarit sentezinde rol oynayan glukoziltransferazlar olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda bu genlerin hücre duvarı bütünlüğü, konjugasyon gibi bazı diğer önemli fonksiyonları olduğu da gözlenmiştir. Yine bu genlerin ozmotik stres varlığında aşırı eksprese edildiği ve korunmada önemli olduğu da gözlenmiştir (95, 96).

eDNA (hücre dışı DNA) enterokok biyofilmlerinin mikrokoloni formasyonundan olgun formasyona geçişinde oldukça önemli bir bileşendir. *gelE* gibi jelatinazlar ve bazı proteazlar konak dokusunun yıkımında önemli rol oynarlar. eDNA' nın ölü hücrelerden daha çok canlı hücrelerden salındığı ve bu salınımı sağlamada *atlA* geninin kodladığı AtlA otolizin proteinin rol aldığı gösterilmiştir. Bunu takriben quorum sensing sisteminin bir parçası olan *fsr* operonu sayesinde salınan eDNA toplanır ve biyofilm yapısına dahil edilir. Biyofilm oluşturan enterokoklarda oluşturmaya kıyasla antibiyotik direnç genlerinin ekspresyonunda ve mobil genetik elemanların sayısında artışlar gözlenmektedir. Bundan temel sorumlu mekanizmanın feromona yanıt veren plazmitler aracılı yatay gen geçişlerinin olduğu düşünülmektedir. Kümelenme ve biyofilm formasyonu mevcudiyeti feromon ilişkili yatay gen geçişi mekanizmalarının oluşum sıklığını artırmaktadır (20, 25).

Biyofilm oluşumunun dağılma basamağı yeterince aydınlatılmış bir konu değildir. *E. faecalis*' in genomunda 7 adet profaj taşıdığı ve AI-2 sinyali ile bunların ekspresyonunu tetiklemesi sonucu hücre otolizinin gerçekleştiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu otoliz süreci biyofilm formasyonunun içinde boşluklar yaratarak fajla enfekte olmamış hücrelerin dağılmasını kolaylaştırır. DNAaz, α -amilaz ve jelatinaz da bu sürece katkı sağlayan diğer faktörlerdir (95). Biyofilm oluşumunda rol alan moleküller ve görevleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Enterokokların biyofilm oluşumunda rol alan moleküller ve görevleri

Görevli Molekül	Formasyon Oluşumundaki Görevi
Ebp (Endokardit ve biyofilm ilişkili pilus)	Fibronektin gibi serum proteinleri aracılı ilk tutunma ve adezyondan sorumlu molekül
Agg (Agregasyon Faktörü)	Başlangıç adezyonu ve bakteri kümelenmesinden sorumlu molekül
Esp (Enterokokal Yüzey Proteini)	Kollajene bağlanarak başlangıç yüzey adezyonu açısından esas rolü oynayan, aynı zamanda biyofilm matriksine sertlik katan molekül
pilA ve pilB	Tip 4 pilus sisteminin üyesi olan ve başlangıç adezyonuna yardımcı piluslar
Epa (Enterokokal Polisakkarit Antijen)	Zayıf tutunma aşamasından mikrokoloni oluşumu ve olgun biyofilm aşamasına geçişteki esas molekül
eDNA (Çevresel DNA)	Mikrokoloni oluşumu ve olgun biyofilm aşamasına geçişte yardımcı molekül
Jelatinaz	Konak doku yıkımı ve bu yıkım sonucu eDNA oluşumundan sorumlu molekül
AtlA otolizin proteini ve <i>fsr</i> operonu	Konak dokudan eDNA salınımı ve salınan eDNA'nın biyofilm formasyonu yapısına katılımı
AI-2 sinyali aracılı indüklenen profajlar	Profajların tetiklediği otoliz sonucu biyofilm formasyonunun yıkımı
DNAaz ve α -amilaz	Biyofilm formasyonunun yıkımında yardımcı moleküller

2.3.1. Biyofilm Formasyonunun Enfeksiyonlardaki Önemi

Biyofilm formasyonunun mevcudiyeti bakterilerin virülansına ve enfeksiyon gelişimi-tedavi sürecine birçok yoldan etki eder. Biyofilm formasyonu içinde temas halinde olan bakteriler çeşitli virülans faktörlerini kodlayan genler ve antibiyotik direnç genleri gibi genetik materyallerinin yatay olarak transferine planktonik bakterilere kıyasla çok daha eğilimlidirler. Önemli bir husus ise biyofilm formasyonunun mikroorganizmaların kolonize olmasını ve kalıcılık sağlamasını kolaylaştırmasıdır. Bu duruma yatkınlık oluşturan süreç in vivo olarak bir pıhtı, kistik fibroziste olduğu gibi çok yoğun kıvamlı bir mukus veya birçok durumda hasar görmüş bir epitel mevcudiyeti olabileceği gibi daha sık olarak tıbbi

girişimlerle yerleştirilen kateterler, stentler, kalp kapakçıkları ve protez materyaller gibi yabancı cisimlerin bulunmasıdır. Yine kompleman sistemi ürünleri veya antikorlar ile fagositozda etkin olan makrofaj, dendritik hücre gibi immün sistem hücrelerine karşı sağladığı koruma da biyofilm formasyonunun mikroorganizmalara sağladığı önemli katkılardandır (97).

Biyofilm oluşumunun enfektif endokardit, kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonları, biliyer stent varlığı ile ilişkili intaabdömal enfeksiyonlar, şant enfeksiyonları ilişkili santral sinir sistemi enfeksiyonları, periodontit gibi ağız-diş enfeksiyonları ile yumuşak doku enfeksiyonları başta olmak üzere pek çok enterokok kaynaklı enfeksiyonda önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (95, 97, 98, 99). Bu enfeksiyonlar arasında mortalitesi en yüksek olanlar ve enfeksiyon gelişim-tedavi süreci üzerinde biyofilm formasyonunun üzerinde en fazla durulan enfektif endokardit ve kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır.

İntravasküler kateterler sıvı, kan ürünü, total parenteral nütisyon sıvısı uygulama ve hemodinamik monitorizasyon sağlama gibi amaçlarla vasküler erişim sağlaması açısından çok yaygın olarak kullanılan cihazlardır. Enfeksiyon gelişme sıklığı hastaya ve kateter takımı ile kateter takibinde alınan enfeksiyon kontrol önlemleri gibi bazı faktörlere de bağlı olmakla birlikte; özellikle kateter tipi (tünelsiz, çoklu lümenli, antibiyotik emdirilmemiş ve hiperalimentasyon-hemodiyaliz için kullanılan kateterler ve santral venöz kateterler daha riskli), kateter yerleşim yeri (femoral daha riskli) ve kateter kalış süresi gibi faktörlerle ilişkilidir. En sık bulaş kaynağı ise kateter giriş yeri ve kateter hub'ından olur. Bölgesel olarak veya hasta özellikleri bazında değişiklikler gözlenebilmekle birlikte enterokoklar kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarında genelde üçüncü en sık etken olarak gözlenmektedirler. Yine önemli bir nokta kateter ilişkili oluşan biyofilm formasyonunun kan akışını bloke edebilmesi ve diğer bakterilerin, trombosit ve eritrositlerin de tutunabildiği pıhtı formasyonunun yüzeyden ayrıldığı durumlarda embolik olaylara da neden olabilmektedir (97).

Enterokoklar yapılan birçok çalışmada streptokok (özellikle viridans grup) ve stafilokokların ardından en sık üçüncü endokardit etkeni olarak tespit edilirken enterokoklar içinde ise daha sık *E. faecalis* etken olarak görülmüştür. Biyofilm formasyonu enfektif endokardit patogenizinde temel olarak 3 şekilde rol oynar; ilki formasyonun direkt olarak kapakçık üzerindeki mekanik hasarı (vejetasyon) ve buna bağlı fonksiyon hasarı, ikincisi biyofilm

formasyonunun aracı olduğu pıhtının ayrışması sonucu özellikle el ayak parmakları, retina gibi vücut kısımlarında gelişen embolik olaylar ve üçüncüsü formasyondan aralıklı olarak salınan planktonik mikroorganizmaların enfeksiyonun sürekliliğini ve kronikliğini sağlaması aracılı gelişen immün yanıtla ilişkili osler nodülü ve glomerülonefrit gibi fenomenlere neden oluşudur. Yapılan bir çalışmada endokardite neden olan enterokok izolatlarının %39'u güçlü biyofilm formasyonu oluştururken bu oran endokardite neden olmayan izolatlarda sadece %6 olarak gözlenmiştir. Biyofilm ilişkili gelişen tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi antibiyotiklere olan duyarlılıkta azalma da önemli bir noktadır (35, 98).

Yine kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarında enterokoklar sık karşılaşılan etkenlerdir. Kateterin oluşturduğu mekanik hasar; mikroorganizmaların kateter yüzeyine yapışmasında ve burda neden oldukları biyofilm formasyonu sayesinde idrarın yıkayıcı etkisine, asidik pH'ına ve konak bağışıklık sistemine karşı korunmasında önemli rol oynamaktadır. Yine biyofilm formasyonu başka bakterilerin buraya kolonize olması ve idrar akımının blokajı ile böbrek hasarı gibi olaylara da neden olabilir (99).

Biyofilm, mikroorganizmaların antimikrobiyal direnç geliştirmesi açısından önemli bir oluşumdur. Biyofilm formasyonunun antibiyotik direncine yol açmasına neden olan 3 temel yol vardır. İlki; biyofilm içine antibiyotiklerin çoğunun -azalmış penetrasyon, matriks ve yüzey tabakası tarafından deaktive edilme veya bağlanma yoluyla- mikroorganizmalara ulaşımının kısıtlanması şeklindedir. İkinci yol; biyofilm formasyonundaki biyokimyasal değişikliklerdir. Formasyonun yüzeyi daha oksijenli bir ortam sunarken çoğunlukla derin kısımlar daha az oksijen barındırırlar. Ayrıca azalan besin maddeleri veya biriken metabolik atıklar pH değişikliklerine ve bazı kısımlarda bakterilerin bölünmelerini azaltmalarına da neden olurlar. Tüm bu değişiklikler antimikrobiyallerin etkinliklerinde azalmalara ve formasyondaki mikroorganizmalara karşı etkinliklerinin heterojen olmalarına neden olur. Üçüncü ve son yol ise biyofilm formasyonunun sağladığı artmış bakteriyel yaklaşma ile feromon aracılı konjugasyon sayesinde plazmit aracılı direnç geni kazanmalarıdır (100).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından 27.02.2024 tarihinde DA 24/02 proje numarasıyla onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

3.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereç ve Malzemeler

3.1.1. Gereçler

Çalışma boyunca kullanılan gereçler şu şekildedir:

- . Etüv (Nüve, Türkiye)
- . Otoklav (Hirayama, Japonya)
- . Pastör Fırını (Nüve, Türkiye)
- . Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- . Santrifüj (Hettich, Almanya)
- . Biyogüvenlik kabini (Heraeus, Almanya)
- . Vorteks (Daihan, Güney Kore)
- . pH metre (Inolab, Almanya)
- . Isı Bloğu (Biosan, Türkiye)
- . Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- . Işık Mikroskopu (Leica, Almanya)
- . Orbital Çalkalayıcı (shaker) (Barnstead International, ABD)
- . Spektrofotometre (Becton Dickinson, ABD)
- . Epoch Mikroplak Spektrofotometre (Biotek, ABD)
- . Termal Döngü Cihazı (Labnet, Finlandiya)
- . Elektroforez tankı ve jel tarağı (Owl EasyCast B2, Thermo Scientific, Danimarka)
- . Gel Doc XR Jel Görüntüleme Cihazı (Bio-RAD, ABD)
- . Çok kanallı pipet (Eppendorf, Almanya)
- . Otomatik pipet seti 0,5-10; 20-200; 100-1000 µl (Eppendorf, Almanya)
- . 10; 200; 1000; 10000 µl steril pipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- . 10; 200; 1000; 10000 µl steril filtreli pipet ucu (Eppendorf, Almanya)
- . Balon joje
- . Petri kabı (Fıratmed, Türkiye)

- . 1,5 ml mikrosantrifüj tüp (Isolab, Almanya)
- . 0,2 ml PZR tüpü (Isolab, Almanya)
- . Steril plastik öze (Fıratmed, Türkiye)
- . Steril pamuk uçlu eküvyon çubuk
- . 16 x 100 mm cam deney tüpü
- . 15; 50 ml falkon tüpü (Isolab, Almanya)
- . 5; 10; 20 ml steril tek kullanımlık enjektör
- . Cam lam (Citotest Labware, Çin)
- . 96 kuyucuklu non-pirojenik steril düz tabanlı mikroplak (Corning, ABD)

3.1.2. Besiyerleri, Kimyasallar ve Kitler

- . %5 Koyun kanlı agar (Orbak, Türkiye)
- . %5 Gliserol besiyeri (BD Difco, ABD)
- . Triptik soy sıvı besiyeri (CondaLab, İspanya)
- . Mueller-Hinton II agar (Neogen, ABD)
- . Kinupristin-Dalfopristin Antibiyotik Diskleri (MASTDISCS, Birleşik Krallık)
- . Eravasiklin Antibiyotik Diskleri (Liofilchem, İtalya)
- . Ampisilin, imipenem, vankomisin, teikoplanin, gentamisin, streptomisin, siprofloksasin, tetrasiklin Antibiyotik Diskleri (Bioanalyse, Türkiye)
- . Vankomisin, teikoplanin, gentamisin, streptomisin, eravasiklin, tetrasiklin antibiyotik Stripleri (Liofilchem, İtalya)
- . Safra-Eskülin agar (BD Difco, ABD)
- . Agaroz D-1 Low Eeo (CondaLab, İspanya)
- . DrySlide PYR Kiti (BD BBL, ABD)
- . Distile Su
- . Deiyonize Su
- . Steril %0,9'luk Serum Fizyolojik (Turkfleks, Türkiye)
- . %3'lük Hidrojen peroksit (Norateks, Türkiye)
- . Gram Boyama Seti (RTA, Türkiye)
- . Kristal Viyole Tozu (Sigma Aldrich, Almanya)
- . Metanol (İnterlab, Türkiye)
- . %95 Etanol (İnterlab, Türkiye)

- . PBS tablet pH 7,2 (AppliChem, Almanya)
- . EDTA (SRL, İtalya)
- . TrisBase (Sigma Aldrich, Almanya)
- . Borik asit molecular biology grade (AppliChem, Almanya)
- . Etidyum Bromür (AppliChem, Almanya)
- . ‘‘Hs PrimeTaq Premix’’ marka master miks (Genet Bio, Güney Kore)
- . Nükleaz içermeyen su (Sigma Aldrich, Almanya)
- . Primerler (Probe Synthesis, Türkiye)
- . 100 bp plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.2. İzolat Tanımlaması

Çalışmamıza Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi (Merkez 1), Başkent Üniversitesi Adana Dr. Turgut Noyan Uygulama ve Araştırma Merkezi (Merkez 2) ve Ankara Etlik Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında (Merkez 3) kan örneklerinden izole edilerek tanımlanan toplam 45 adet *E. faecalis* ve 45 adet *E. faecium* klinik izolatu (her merkezden 15 *E. faecalis* ve 15 *E. faecium* olacak şekilde) antibiyotik direnç paternlerine bakılmaksızın rastgele ve her hastadan tek izolat olacak şekilde dahil edildi. Merkez-1’deki kökenler Ekim 2023-Aralık 2024; Merkez 2’deki kökenler Ekim 2021-Mart 2025 ve Merkez 3’deki kökenler ise Ocak 2024-Mayıs 2024 arasında izole edildi.

Her 3 merkezde de kan kültürü şişeleri aynı otomatize kan kültürü sisteminde (BD BACTEC FX bottom, ABD) pozitif sinyal verene kadar veya 5 günlük süre boyunca inkübe edildi. Bu süre sonunda üreme göstermeyen örnekler üreme olmadı şeklinde raporlanırken pozitif sinyal veren örneklerin gram boyama ile %5 koyun kanlı ve eozin metilen blue (EMB) besiyerlerine ekim işlemleri gerçekleştirildi. Sinyal ve gram boyama sonuçları panik değer olarak ilgili yetkililere bildirildi. Sinyal pozitifleşme süreleri örneklerin cihazdaki pozitif sinyal verme zamanından örnek kabul zamanının çıkarılması ile tespit edildi. Toplamda 30’u *E. faecalis* ve 30’u *E. faecium* olmak üzere 60 izolat için bu süreler tespit edilebilmiştir.

Her merkezin kendi laboratuvarında tanımladığı izolatlar önce gram boyama özellikleri ve fenotipik yöntemlerle [katalaz testi, koyun kanlı ve safra-eskülin besiyerinde üreme özellikleri, ve L-Pirolidonil β -Naftilamid (PYR) testi] cins düzeyinde *Enterococcus* spp. olarak doğrulandı. Ardından MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı ile tür

düzeyinde [Merkez 3'teki izolatlar ilk tanımlamaları zaten MALDI-TOF MS ile yapıldığı için bu basamaktan geçirilmedi.] doğrulandı.

Tanımlamaları ve doğrulamaları tamamlanan izolatlar belirlenen antibiyotiklere duyarlılıkları açısından disk difüzyon yöntemi ile test edildi. Takip eden süreçte belirlenen protokolle izolatların biyofilm oluşturma oranları ve düzeyleri belirlendi, polimeraz zincir reaksiyonu ile yüksek düzey aminoglikozit direncine yol açan AME genlerinin ve glikopeptit direncine yol açan genlerin varlığı incelendi. Elde edilen sonuçlar birbiriyle ilişkilendirilip çeşitli parametreler açısından değerlendirildi. Aşağıda, izolatların tanımlanması amacıyla yapılan testler detaylandırıldı.

3.2.1. Gram Boyama ve Koloni Morfolojisi

%5'lik koyun kanlı agarla soğuk zincir koşullarında merkezimize ulaşan 90 izolatın her biri ilk olarak koloni rengi, büyüklüğü ve şekli açısından ve plağın saf üreme gösterip/göstermemesi açısından yansıyan ışık altında dikkatlice değerlendirildi. Bunu takiben hazır olarak temin edilen gram boyama seti (RTA, Türkiye) ile gram boyama işlemi gerçekleştirildi ve ışık mikroskopu ile 1000X büyütmede immersiye yağlı preparatlar incelendi. Gram boyama sonucu gram pozitif ve tek, çift, kısa zincir veya daha nadiren kümeli kok görünümünde olan örnekler daha ileri fenotipik testlerle değerlendirildi.

3.2.2. Katalaz Testi

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti (H_2O_2) metabolize ederek su ve oksijen meydana getirir. Meydana gelen oksijen, testin yapıldığı lam veya ortam üzerinde gaz kabarcığı olarak gözlenir. Bu testi uygularken kullanılan malzemeler %3'lük hidrojen peroksit, cam lam ve steril plastik öze idi.

Test uygulanırken temiz bir lama 1-2 damla %3'lük H_2O_2 damlatıldı. 16-24 saatlik inkübasyon sonrası gram pozitif kok olarak boyanan bakterilerden steril plastik öze ile alınan 1-2 koloni H_2O_2 ile karıştırıldı. Saniyeler içinde oluşan kabarcıkların test pozitifliğine işaret ettiği kabul edildi.

Test uygulanırken koloni alınımı sırasında besiyeri içeriğini barındırmayan yüzeysel örnekler alınımına özen gösterildi [Eritrositler içerdikleri katalaz aktivitesi sonucu yanlış pozitif sonuçlara yol açabilirler (101).]. Bu testin kalite kontrolünde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29212 ve negatif kontrol olarak *S. pyogenes* ATCC 13813 suşları kullanıldı.

3.2.3. Koyun kanlı ve safra-eskülin besiyerinde üreme özellikleri

Koyun kanlı agarda (Orbak, Türkiye) tek koloni ekim yöntemi ile merkezlerden gelen tüm izolatların subkültürü yapıldı. Enterokok kolonileri bir gecelik inkübasyon sonrası 1-2 mm boyutlarında, düzgün kenarlı, gri, hemolizsiz ya da alfa hemolitik veya çok daha az sıklıkla beta hemolitik olan kolonilerdir. Safra eskülin agara (BD Difco, ABD) ekim de yine tek koloni metoduyla fakat inokulumun yoğun olmamasına dikkat ederek tüm izolatlar için uygulandı. Yoğun inokulumun yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceği belirtilmektedir (101). Bazı diğer laktokok, pediokok ve streptokok türlerinde de pozitiflikleri görmek mümkün olmakla birlikte eşlik eden katalaz negatifliği ve gram boyama özellikleri çok yüksek oranda enterokok veya Grup D streptokok mevcudiyetini düşündürür. Bu iki türün birbirinden ayrımında ise %6,5'lik tuz konsantrasyonunda üreyebilme özelliğinin değerlendirilmesi mümkündür. Enterokoklar bu durumda üreyebilirken Grup D streptokoklar üreyemezler (101).

3.2.4. L-Pirolidonil- β Naftilamid (PYR) Testi ve Uygulanışı

PYR testi ticari olarak birçok firma tarafından sununan kitler aracılığıyla kolaylıkla uygulabilen özgün ve duyarlı biçimde hızlı fenotipik ayırım sağlama yeteneği dolayısıyla sıklıkla tercih edilen bir biyokimyasal testtir. Bu test pirolidonil arilamidaz enzimini tespit eder ve başta *E. faecalis* ve *E. faecium* olmak üzere birçok enterokok türleri ile Grup A- β -hemolitik streptokoklarda (*S. pyogenes*) olmak üzere pozitif sonuç gösterir.

Bu testi uygularken kullanılan malzemeler steril plastik öze, steril distile su ve hazır olarak temin edilen DrySlide PYR Kiti (BD BBL, ABD) dir. Uygulama basamakları firma önerisi dahilinde şu şekilde yapıldı;

- . Kitten temin edilen zemin üzerine 10 μ l'lik öze ile bir öze dolusu steril distile su eklendi.
- . Bu suyun üzerine başka bir özenin iğne kısmı ile saf üremiş plaktan elde edilen 1-2 koloni eklendi ve nazıkçe yayıldı.
- . Oda ısısında 2 dakika boyunca inkübe edildi.
- . Ardından kit içinden çıkan "BBL DrySlide PYR Color Developer" dan bir damla eklendi.
- . 1 dakika içinde meydana gelen pembe/fuşya renk pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Bu testte beklenen pozitif reaksiyon, PYR metabolitinin parçalanmasıyla oluşan β -Naftilamid'in indikatör (N,N- dimetil aminosinamaldehit) eklenmesi ile gözlenen pembe-

mor renk değişikliğidir (44). Bu testin kalite kontrolünde pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 ve negatif kontrol olarak *S. agalactiae* ATCC 13813 suşları kullanıldı.

Lateks aglütinasyon testi ve %6,5'lik NaCl'de üreyebilme yeteneği testi , fenotipik testler sonrası MALDI-TOF MS ile doğrulama yapılacağı göz önünde bulundurularak yapılan diğer fenotipik testler arasına eklenmedi.

3.2.5. Tanımlanan İzolatların MALDI-TOF MS ile Doğrulanması

Merkezimizde fenotipik olarak cins düzeyinde enterokok oldukları doğrulan Merkez 1 ve Merkez 2 izolatları Merkez 3'te MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı ile son doğrulama basamağına alındı. Bu basamak zaten merkezin kendisinde ilk tanımlama bu cihazla yapıldığı için Merkez 3'ten elde edilen 30 izolata uygulanmadı.

Merkez 3'te kendi merkezlerinden gelen 30 izolata ilk tanımlamada; diğer merkezlerden gelen 60 izolata ise fenotipik doğrulama sonrası yapılan koyun kanlı agardaki subkültürü takiben olmak üzere MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı ile tanımlama yapıldı. İlk olarak hedefte ekstraksiyon yöntemi kullanılarak formik asit aracılığıyla hücre duvarı yıkımı sağlandı. Kuruma beklendikten sonra alfa-siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) matriks solüsyonu ile işleme tabi tutuldu. Sonrasında cihaza yerleştirildi ve cihazın değerlendirmesi beklenildi. Değerlendirme diğer birçok mikroorganizmada olduğu gibi temel olarak rRNA yapıları üzerinden otomatik olarak yapıldı. Değerlendirmenin ardından elde edilen skorlar; skor <1.7 ise tanımlama güvenilirmez, 1.7-2 arasında ise cins düzeyinde ve >2 ise tür düzeyinde tanımlama olarak yorumlandı. 90 izolatın tamamında elde edilen skorlar 2'nin üzerindeydi.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların ampisilin, imipenem, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin, tetrasiklin, eravasiklin, kinupristin-dalfopristin (*E. faecium* için), linezolid, gentamisin (yüksek düzey direnci değerlendirmede) ve streptomisin (yüksek düzey direnci değerlendirmede) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle test edildi. Tetrasiklin haricindeki antibiyotiklere duyarlılık sonuçları EUCAST kriterlerine göre (76) tetrasiklin duyarlılık sonucu ise EUCAST rehberinde sınır değerler bulunmadığı için CLSI kriterlerine göre (77) değerlendirildi. *E. faecalis* izolatlarında kinupristin-dalfopristin antibiyotiğine duyarlılığın test edilmeyecek olmasının nedeni bu bakteri-antibiyotik ikilisinin EUCAST'ın dirençli olması beklenen fenotip tablosunda yer almasıdır (3).

Disk difüzyon testi ile yüksek düzey gentamisin veya yüksek düzey streptomisin direnci saptanması sırasında şüphe mevcudiyetinde gentamisin veya streptomisin MİK değeri gradiyent difüzyon testi ile belirlendi. Disk difüzyon testi ile eravasikline direnç saptanması halinde eravasiklin MİK değeri gradiyent difüzyon testi ile belirlendi.

3.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi ile Duyarlılık Belirleme

Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık testi çalışılan tüm izolatlar önceden fenotipik testler ve MALDI-TOF MS ile doğrulanmış ve -20°C’de gliserollü besiyerinde stoklanmış izolatlar olup önce oda sıcaklığında çözdürülüp %5’lik koyun kanlı agara pasaj yapıldı ve örnekler saflıkları açısından değerlendirildi. Bunu takiben %5’lik koyun kanlı agarlara subkültür yapıp aerobik şartlarda 35±2°C’de 18-24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edilmiş bu plaklardaki üremeler duyarlılık testlerinde kullanıldı.

Yukarıda bahsi geçen plaklardaki saf kolonilerden steril %0,9’luk serum fizyolojik içerisinde spektrofotometre ile (Becton Dickinson, ABD) 0.5 McFarland bulanıklık derecesinde olacak şekilde solüsyonlar hazırlandı. Firma önerilerine göre hazırlanıp otoklavda (Hirayama, Japonya) sterilize edilen ve ardından 90 mm çapa sahip steril petri kaplarına 4±0.5 mm kalınlıkta (yaklaşık 25 ml) dökülen Mueller Hinton II agarlara (Neogen, ABD) steril eküvyonlar aracılığıyla yaygın ekim yöntemiyle ekimler yapıldı.

Kullanılincaya kadar -20°C’de saklanan (Eravasiklin firma önerisi dolayısıyla +4°C’de) ampisilin, imipenem, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin, tetrasiklin, eravasiklin, kinupristin-dalfopristin (*E. faecium* için), linezolid, gentamisin (yüksek düzey direnci değerlendirmede) ve streptomisin (yüksek düzey direnci değerlendirmede) antibiyotik diskleri kullanımından 10-15 dakika önce oda ısısına gelmesi için buzdolabından çıkarıldı. Her bir antibiyotik diski bir plakta 5’ten fazla antibiyotik diski olmayacak şekilde steril pens aracılığıyla yaygın ekim yöntemiyle ekilmiş olan plaklara dikkatlice ve tek seferde yerleştirildi. Üzerlerine hafifçe bastırarak besiyeri yüzeyi ile tam temasları sağlandı (104). Bu şekilde hazırlanan plaklar 35±1°C’de 18±2 saat boyunca aerobik inkübasyon koşullarında inkübe edildi. Bu süre EUCAST’in önerileri doğrultusunda vankomisin için 24 saat olarak uygulandı (76).

Değerlendirmeler -vankomisin hariç- yansıyan ışık altında, siyah zemin üzerinde, plakların arka yüzlerinden zon içi kolonilerin var olup olmadığı dikkatlice değerlendirilerek yapıldı. Vankomisin için ise değerlendirme, plak ışığa doğru tutularak ve yine zon içi kolonilerin var olup olmadığı dikkatlice değerlendirilerek plak kapağı kaldırılıp plağın ön yüzünden yapıldı. Vankomisin duyarlılığını değerlendirirken zon sınırlarının keskin sınırlı olmaması durumunda izolatlar duyarlı kategorisiyle uyumlu zon çapları vermiş olsalar bile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile direnç genlerinin mevcudiyeti açısından değerlendirildi (76). Üremenin olmadığı zonun çapı cetvel yardımıyla ölçülerek tetrasiklin hariç EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi (76). Tetrasiklin için değerlendirmede EUCAST sınır değer önerileri mevcut olmadığı için CLSI kriterleri kullanıldı (77). Kalite kontrol kapsamında EUCAST kalite kontrol tablolarındaki hedef değerler ve aralıklar baz alındı, EUCAST önerileri doğrultusunda *E. faecalis* ATCC 29212 kalite kontrol izolatı olarak kullanıldı (105). Disk difüzyon yöntemiyle duyarlılıkları belirlenen antibiyotiklerin sınır değerleri Tablo 3.1.' de belirtilmiştir.

Tablo 3.1. Disk difüzyon yöntemiyle duyarlılık sınır değerleri

	EUCAST*		CLSI**	
Ampisilin	≥10 mm (S)	<10 mm (R)		
İmipenem***	≥50 mm (S)	<21 mm (R)		
Vankomisin	≥12 mm (S)	<12 mm (R)		
Teikoplanin	≥16 mm (S)	<16 mm (R)		
Siprofloksasin	≥15 mm (S)	<15 mm (R)		
Tetrasiklin			≥19 mm (S)	<14 mm (R)
Eravasiklin	≥22 mm (S)	<22 mm (R)		
Kinupristin-Dalfopristin	≥22 mm (S)	<22 mm (R)		
Streptomisin	≥14 mm (YDSD yok)	<14 mm (YDSD var)		
Gentamisin	≥8 mm (YDGD yok)	<8 mm (YDGD var)		
Linezolid	≥20 mm (S)	<20 mm (R)		

* Kaynak 76'dan alındı.

** Kaynak 77'den alındı.

*** ≥50 mm, duyarlılık sonucunun asla standart dozda duyarlı olarak raporlanmaması gerektiğine işaret eder.

**** (S) standart dozda duyarlı ve (R) dirençli kategoriyi ifade ederken bunlar arasında kalan değerler duyarlılık profilinin yüksek dozda duyarlı (I) kategorisine dahil olduğuna işaret eder.

3.3.2. Gradyent Difüzyon Yöntemi ile Duyarlılık Belirleme

Yukarıda tarif edildiği gibi hazırlanan Mueller Hinton II agarlara (Neogen, ABD) yine yukarıda tarif edildiği gibi subkültüre edilmiş saf kolonilerden hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklık değerinde ki solüsyonlardan yaygın ekim yapıldı. Disk difüzyon testi ile yüksek düzey gentamisin ve yüksek düzey streptomisin direnci saptanması sırasında sonuçlarında şüphe bulunan izolatlar yüksek düzey gentamisin ve yüksek düzey streptomisin MİK değerleri açısından gradiyent difüzyon testi ile değerlendirildi. Ayrıca disk difüzyon testi ile eravasiklin direnci gözlenen izolatlarda eravasiklin MİK değeri gradiyent difüzyon testi ile belirlendi.

Gradiyent difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotik stripleri, kullanımından 10-15 dk önce oda ısısına çıkarıldı. Her bir antibiyotik stripi bir plakta 2'den fazla antibiyotik stripi olmayacak şekilde ve bu iki stripin yönleri birbirinin zıttı olacak şekilde steril pens aracılığıyla yaygın ekim yöntemiyle ekilmiş olan plaklara dikkatlice ve tek seferde yerleştirildi. Üzerlerine hafifçe bastırarak besiyeri yüzeyi ile tam temasları sağlandı (106). Bu şekilde hazırlanan plaklar $35\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat boyunca aerobik inkübasyon koşullarında inkübe edildi.

Değerlendirmeler yansıyan ışık altında, siyah zemin üzerinde, plakların ön yüzlerinden eliptik zonun içindeki kolonilerin mevcudiyeti açısından dikkatlice yapıldı. İzolatların MİK değerleri eliptik zonların stripi kestiği yer olarak belirlendi. İnhibisyon zonunun iki değer arasında kalması halinde yüksek olan değer MİK olarak belirlendi. İnhibisyon zonunun her iki tarafta stripi farklı noktalarda kestiği durumlarda fark iki kat dilüsyonu aşmıyorsa yüksek olan MİK değeri sonuç olarak kabul edilirken aştığı durumlarda test tekrarlandı (106). Elde edilen MİK sonuçları duyarlılık kategorisi belirlenmesi açısından EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi (76). Kalite kontrol kapsamında EUCAST kalite kontrol tablolarında ki hedef değerler ve aralıklar baz alındı, EUCAST önerileri doğrultusunda *E. faecalis* ATCC 29212 kalite kontrol izolatı olarak kullanıldı (105). Yüksek doz gentamisin, yüksek doz streptomisin ve eravasiklin MİK sınır değerleri Tablo 3.2.' de belirtilmiştir.

Tablo 3.2. Yüksek doz gentamisin, yüksek doz streptomisin ve eravasiklin MİK sınır değerleri

	EUCAST*
Gentamisin	≤ 128 mg/L (YDGD yok), > 128 mg/L (YDGD var)
Streptomisin	≤ 512 mg/L (YDSD yok), > 512 mg/L (YDSD var)
Eravasiklin	≤ 0.25 mg/L (S), > 0.25 mg/L (R)

* Kaynak 76'dan alınmıştır.

** (S) standart dozda duyarlı ve (R) dirençli kategoriye ifade eder.

3.4. Moleküler Yöntemlerle Direnç Genlerinin Değerlendirilmesi

Fenotipik olarak yüksek düzey gentamisin direnci saptanan izolatlarda, enterokoklarda yüksek düzey gentamisin direncine neden olan *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri; fenotipik olarak yüksek düzey streptomisin direnci saptanan izolatlarda ise yüksek düzey streptomisin direncine neden olan *ant(3'')-Ia* ve *ant(6')-Ia* genleri (80, 81, 82, 83) konvansiyonel PZR ile çalışılmıştır. Fenotipik olarak vankomisin direnci saptanan izolatlar ile disk difüzyon testi sırasında vankomisin inhibisyon zonu kenarı keskin olmayan izolatlarda dirence en sık neden olan *vanA* ve *vanB* genleri konvansiyonel PZR ile araştırılmıştır (88).

3.4.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların DNA izolasyonu daha önceden fenotipik testler ve MALDI-TOF MS ile doğrulamaları yapıldıktan sonra -20°C 'de gliserol besiyerinde saklamaya alınan bakterilerden yapıldı. Bu stoklardan %5'lik koyun kanlı agara pasajlar yapıldı ve 18-24 saat boyunca $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de aerobik ortamda inkübe edildi. Üremeler saflıkları açısından değerlendirildikten sonra aynı koşullarda koyun kanlı agara subkültürü yapıldı. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine (Isolab, Almanya) her izolat için 1 ml olacak şekilde önceden otoklavda (Hirayama, Japonya) sterilize edilmiş deiyonize sudan dağıtıldı. Bu suyun içinde steril plastik özenin iğne kısmıyla besiyeri içeriğini barındırmayacak şekilde dikkatle toplanan birkaç saf koloni süspansiyonu edildi. Ardından tüpler ısı bloğunda (Biosan, Türkiye) 95°C 'de 10 dakika boyunca ısıtılıp 10 dakikanın sonunda buza aktararak şoklandı. Bu basamaklarla sağlanan lizisin ardından hücre atıklarının uzaklaştırılması sağlandı. DNA'nın toplanması amacıyla tüpler santrifüj (Hettich, Almanya) cihazında 14.000 rpm'de 10 dk

santifüj edildi. DNA'nın bulunduğu süpernatant kısmı dipteki hücre atıklarının bulunduğu pellet kısmının alınmamasına dikkat edilerek temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve çalışılınca kadar -20°C'de saklandı (107).

3.4.2. PZR Reaksiyon Miksi Hazırlanması

Vankomisin, gentamisin ve streptomisin olmak üzere üç farklı antibiyotiğe karşı direnç yol açan toplamda 8 gen varlığı araştırıldı. Bunlar vankomisin için *vanA* ve *vanB*; gentamisin için *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* ve streptomisin için *ant(3'')-Ia* ile *ant(6')-Ia* idi.

Fenotipik olarak vankomisin direnci gösteren veya vankomisin inhibisyon zonu kenar keskinliği olmaması nedeniyle dirençten şüphelenilen izolatlarda *vanA* ve *vanB* direncinin tespiti için miks hazırlandı. Kurutulmuş olarak temin edilen primerler (Probe Synthesis, Türkiye) firma önerileri doğrultusunda nükleaz içermeyen su ile konsantrasyonu 100 pmol/ml olacak şekilde sulandırıldı ve bu solüsyonlar stok primer solüsyonları olarak kullanıldı. Bu stok solüsyonlarından kullanıma hazır 10 pmol/ml konsantrasyonunda ikinci solüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan miks her bir izolat için 10 µl HS Prime Taq Premix (Genet Bio, Güney Kore), 1 µl *vanA* primer forward (primer F), 1 µl *vanA* primer reverse (primer R), 1 µl *vanB* primer F, 1 µl *vanB* primer R, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 3 µl DNA içerecek biçimde toplam hacim 20 µl olarak ayarlandı. Pozitif kontrol olarak NCTC 12202 *E. faecium* (*vanA*) (108) ve ATCC 51299 *E. faecalis* (*vanB*) (109) izolatları kullanıldı. Tezde kullanılan tüm primerlerin dizileri ile hedef bölgelerin uzunlukları referanslarıyla birlikte Tablo 3.3.'te ve HS Prime Taq Premix (Genet Bio, Güney Kore)'in içeriği ise Tablo 3.4.'te sunulmuştur.

Tablo 3.3. Primer dizileri ve hedef amplikon boyutları

Primerler	Primer Dizileri	Hedef Amplikon Boyutu	Referans Çalışma
vanA-Forward	5'-GGGAAAACGACAATTGC-3'	732 bp	(111)
vanA-Reverse	5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3'	732 bp	(111)
vanB-Forward	5'-ACGGAATGGGAAGCCGA-3'	647 bp	(111)
vanB-Reverse	5'-TGCACCCGATTTCGTTC-3'	647 bp	(111)
aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia-Forward	5'-CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG-3'	348 bp	(112)
aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia-Reverse	5'-CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC-3'	348 bp	(112)
aph(2'')-Ib-Forward	5'-CTTGACGCTGAGATATATGAGCAC-3'	867 bp	(112)
aph(2'')-Ib-Reverse	5'-GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT-3'	867 bp	(112)
aph(2'')-Ic-Forward	5'-CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC-3'	444 bp	(112)
aph(2'')-Ic-Reverse	5'-CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG-3'	444 bp	(112)
aph(2'')-Id-Forward	5'-GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC-3'	641 bp	(112)
aph(2'')-Id-Reverse	5'-CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC-3'	641 bp	(112)
ant(3'')-Ia-Forward	5'-TGATTGCTGGTTACGGTGAC-3'	284 bp	(113)
ant(3'')-Ia-Reverse	5'-CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG-3'	284 bp	(113)
ant(6')-Ia-Forward	5'-CGGGGAGAATGGGAGACTTTG-3'	563 bp	(114)

Fenotipik olarak gentamisin direnci gösteren izolatlarda *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* mevcudiyetinin tespiti için miks hazırlandı. Konuyla ilgili literatür taraması sonrası en sık tespit edilen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni için monopleks diğer 3 gen için multipleks PZR gerçekleştirildi. *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* için 10 µl HS Prime Taq Premix (Genet Bio, Güney Kore), 1 µl *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* primer F, 1 µl *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* primer R, 5 µl nükleaz içermeyen su ve 3 µl DNA ile toplam hacim 20 µl olarak ayarlandı. Primerler yukarıda tarif edilene benzer şekilde fakat miskteki nihai primer konsantrasyonu 25 pmol olacak şekilde sulandırıldı. Pozitif kontrol olarak ATCC 51299 (110) izolatı kullanıldı. Kalan 3 gen için oluşturulan mikst ise 10 µl HS Prime Taq Premix (Genet Bio, Güney Kore), 1 µl *aph(2'')-Ib* primer F, 1 µl *aph(2'')-Ib* primer R, 0.5 µl *aph(2'')-Ic* primer F, 0.5 µl *aph(2'')-Ic* primer R, 0.5 µl *aph(2'')-Id* primer F, 0.5 µl *aph(2'')-Id* primer R, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 3 µl DNA ile toplam hacim 20 µl olarak

ayarlandı. Miks içindeki primerlerin son konsantrasyonu *aph(2'')-Ib* için 25 ve diğer iki primer çifti için ise 5 pmol/ml olacak şekilde ayarlandı.

Fenotipik olarak streptomisin direnci gösteren izolatlarda *ant(3'')-Ia* ve *ant(6')-Ia* mevcudiyetinin tespiti için miks hazırlandı. Bu iki gen bölgesi için multipleks PZR oluşturuldu. 10 µl HS Prime Taq Premix (Genet Bio, Güney Kore), 1 µl *ant(3'')-Ia* primer F, 1 µl *ant(3'')-Ia* primer R, 1 µl *ant(6')-Ia* primer F, 1 µl *ant(6')-Ia* primer R, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 3 µl DNA ile toplam hacim 20 µl olarak ayarlandı. Primerler; miksteki nihai primer konsantrasyonu *ant(3'')-Ia* için 10 ve *ant(6')-Ia* için 10 pmol olacak şekilde sulandırıldı. Pozitif kontrol olarak (*ant(6')-Ia*) ATCC 51299 *E. faecalis* (110) izolatu kullanıldı.

Tablo 3.4. HS Prime Taq Premix İçeriği (2X)

	Konsantrasyon
HS Prime Taq DNA Polimeraz	1 Ünite/10 µl
Reaksiyon tamponu	2X
Magnezyum Klorür (MgCl ₂)	4 mM
Enzim Stabilizörü	-
Yükleme Boyası	-
Deoksi Nükleotit Trifosfat**	0.5 mM

* Kit içeriğinde konsantrasyonu belirtilmeyen ürünler “-” ile gösterilmiştir.

** Her bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP için

3.4.3. Amplifikasyon

Direnç genlerinin tespitinde kullanılacak amplifikasyon döngüleri, kullanılan master miksin kılavuzunda önerilen amplifikasyon döngüsü esas alınarak belirlendi. Her bir reaksiyon için minör değişiklikler yapılarak elde edilen sonuçlar başarılı bulundu. Amplifikasyon döngüleri termal döngü (Labnet, Finlandiya) cihazı ile gerçekleştirildi.

Vankomisin direnç genleri açısından gerçekleştirilen multipleks PZR için optimize edilen döngü 95°C’de 10 dk ilk denatürasyon, 30 döngü boyunca 95°C 30 saniye denatürasyon, 51°C 30 saniye primer bağlanması, 72°C 60 saniye uzama ve 72°C’de 5 dk son uzama şeklinde ayarlandı.

Yüksek düzey gentamisin direnç genleri açısından *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni için monopleks; *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri için ise multipleks olarak PZR

çalışıldı. Her 2 miks için de aynı amplifikasyon döngüleri kullanılmış olup 95°C’de 10 dk ilk denatürasyon, 35 döngü boyunca -95°C 30 saniye denatürasyon, 55°C 30 saniye primer bağlanması, 72°C 40 saniye uzama- ve 72°C’de 5 dk son uzama şeklinde idi.

Yüksek düzey streptomisin direnç genleri açısından gerçekleştirilen multipleks PZR için optimize edilen döngü ise 95°C’de 10 dk ilk denatürasyon, 35 döngü boyunca 95°C 30 saniye denatürasyon, 55°C 30 saniye primer bağlanması, 72°C 40 saniye uzama ve 72°C’de 5 dk son uzama şeklinde idi.

3.4.4. PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Analizi

TBE tampon solüsyonunu 5X konsantrasyonda (stok) hazırlamak için uygun miktarda EDTA (SRL, İtalya), TrisBase (Sigma Aldrich, Almanya) ve borik asit (AppliChem, Almanya) 1 litre deiyonize su içerisinde çözülerek pH’ı -pH metre (Inolab, Almanya) aracılığıyla- 8,3 olacak şekilde ayarlandı. Bu 5X konsantrasyonda kabul edilen solüsyon 1/10 oranında deiyonize su aracılığı ile 0.5X konsantrasyona seyreltildi.

Elektroforez için %2’lik jel hazırlamada 90 ml 0,5X konsantrasyondaki TBE’ye 1,8 gram agaroz (CondaLab, İspanya) eklendi ve mikrodalga cihazında (Arçelik, Türkiye) homojenize olup çözülmesi sağlandı. Mikrodalga cihazından çıkartılan solüsyonun biraz soğuması beklendikten sonra üzerine 3 µl etidyum bromür (AppliChem, Almanya) eklendi. Bu solüsyon yüklenecek örnek sayısına göre seçilen tarağın yerleştirildiği jel tankına (Owl EasyCast B2, Thermo Scientific, Danimarka) döküldü. Donması beklenen jelin üzerini örtecek kadar 0.5X TBE tampon solüsyonu tanka eklendi.

Kuyucukların büyüklüğüne göre değişmekle birlikte ortalama 6-8 µl PZR ürünü kuyucuklara yüklendi. İzolatlarla beraber her jel için çalışılan gen bölgelerinin pozitif kontrol ve negatif kontrol örnekleri kuyucuklara yüklendi. Kullanılan master miks (Hs PrimeTaq Premix, Genet Bio, Güney Kore), içeriğinde yükleme solüsyonu içeren bir master miks olmasından ötürü örnekler kuyucuklara direkt olarak yüklendi. 1,5 saat boyunca 100 V gerilim altında tanka bağlanan elektrotlar sayesinde negatif kutuptan pozitif kutuba doğru kuyucuklardaki içeriğin yürümesi sağlandı. Elektroforez süresi tamamlandıktan sonra jele eklenen etidyum bromürün (AppliChem, Almanya) DNA’ya bağlanan ve UV ışık altında parlayan yapısından ötürü Gel Doc XR jel görüntüleme cihazı ve buna bağlı çalışan “Image Lab” yazılımı ile (Bio Rad, ABD) jel değerlendirildi.

PZR bantlarının boyutlarını değerlendirebilmek amacıyla ilk kuyucuğa 100 bp'lik DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) yüklendi.

3.5. Biyofilm

Çalışmamızda izolatlarımızın biyofilm oluşturma oranları, oluşan biyofilmlerin zayıf/orta/güçlü olarak kategorizasyonu ve izolatların biyofilm formasyonu ile antimikrobiyal direnç oranları arasındaki ilişki değerlendirildi.

3.5.1. Biyofilm Oluşturma Protokolü

-20°C'de gliserol besiyerinde saklanan bakterilerden %5'lik koyun kanlı agara pasajlar yapıldı ve 18-24 saat 35±2°C'de aerobik ortamda inkübe edildi. Aynı işlem saf olan kolonilerden yapılan subkültürle tekrarlandı. Buradan alınan koloniler cam deney tüplerindeki 4-5 ml triptik soy besiyerine (CondaLab, İspanya) (TSB) eklendi ve yoğun bir süspansiyon hazırlanarak 35±2°C'de 1 gece aerobik ortamda orbital çalkalayıcı (shaker) (Barnstead International, ABD) üzerinde inkübe edildi. Etüvden çıkarılan örnekler başka bir TSB dağıtılmış cam tüpler içerisinde vorteks ile karıştırıldı ve 0.5 McFarland bulanıklık standardına ayarlandı. 96 kuyucuklu non-pirojenik steril düz tabanlı mikropklara (Corning, ABD) her izolat için 3'er kuyucuk olacak şekilde 180 µl TSB ve 20 µl hazırlanmış olan 0.5 McFarland bulanıklık standardındaki bakteri solüsyonlarından eklendi ve her bir kuyucuğun 10⁷ CFU/ml sayıda bakteri içermesi sağlandı. Bu şekilde hazırlanmış olan mikropklar biyofilm oluşumuna olanak tanımak için 35±2°C'de 24 saat boyunca aerobik ortamda orbital çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaklar etüvden çıkartılarak çok kanallı pipetler (Eppendorf, Almanya) aracılığıyla boşaltıldı ve her kuyucuğa 3 kez 200 µl PBS (AppliChem, Almanya) eklenerek yıkandı; bu sayede biyofilm oluşturmayan planktonik hücreler uzaklaştırılırken, biyofilm oluşturanlar kuyucuklarda kalmaya devam etti. Yıkama sonrası her bir kuyucuğa 200 µl metanol (İnterlab, Türkiye) eklenerek 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve biyofilm formasyonunun fikse olması sağlandı. Ardından kuyucuklardaki metanol boşaltıldı ve 3 kez PBS ile yıkama basamağı tekrar edildi. Formasyonu boyamak ve mikropklak okuyucuda değerlendirilebilir optik yoğunluk (OY) değerleri gözlemleyebilmek için her bir kuyucuğa %2 kristal viyole eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında boyanma beklendi. Ardından kuyucuklardaki %2 kristal viyole boşaltıldı ve 3 kez PBS ile yıkama basamağı tekrar edildi. Bu basamağın ardından kuyucuklarda kalan hücrelerin neredeyse tamamının biyofilm oluşturan hücreler olduğu kabul edildi. Yıkama sonrası her bir kuyucuğa 200 µl %95 etanol (İnterlab, Türkiye) eklenerek hem kuyucuk tabanı hem de kuyucuk duvarındaki

formasyon oluşturan hücrelerin çözülmesi sağlandı. Etanol eklenmesi sonrası 540 nm’de OY değerleri Epoch mikropalak spektrofotometre (Biotek, ABD) cihazı ile ölçüldü (115).

İnkübasyonun çalkalayıcı üzerinde yapılması ve inkübasyondan önce yapılan vorteksleme işleminin 3 önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar; in vivo kan akışıyla ilişkili olarak damar içi akışkanlar mekaniğine bağlı oluşan “shear stress” ortamının in vitro olarak taklit edilebilmesine olanak tanınması, biyofilm kuyucuklarında homojenizasyonu etkin olarak sağlayarak kuyucuklar arasında OY değerlerinin birbirine yakınlık göstermesi ve yanlış pozitif sonuçlara yol açabilen biyofilm oluşumundan bağımsız hücre kümelerinin oluşumunun engellenmesidir (115).

3.5.2. Biyofilm Oluşumunun Değerlendirilmesi

Her plak için 3’er kuyucuk içeren sterilite kuyucukları, negatif kontrol (NK) kuyucukları ve pozitif kontrol (PK) kuyucukları oluşturuldu. Sterilite kuyucukları 200 µl TSB içerirken pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 6538 ve negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşları kullanıldı. Epoch mikropalak spektrofotometre (Biotek, ABD) cihazından alınan kuyucuk OY değerleri kaydedildi. Sterilite kontrol kuyucuklarının OY ortalamaları ve 3 kuyucuğun standart sapma değerleri hesaplandı. Sterilite kuyucuklarının ortalama OY değerine; standart sapma değerinin 3 katının eklenmesi ile sınır değer (cutoff OY/OY_c) belirlendi. Kalan tüm izolatlar için (negatif ve pozitif kontrol örnekleri dahil) kuyucukların OY ortalamaları belirlendi. Önerildiği üzere izolatlar için hesaplanan OY ortalaması eğer OY_c değerine eşit veya ondan düşükse bakterinin biyofilm oluşturmadığı (0); OY_c ile OY_c’nin 2 katı arasında ise zayıf güçte (+) biyofilm oluşturduğu; 2 OY_c ile 4 OY_c arasında ise orta güçte (++) biyofilm oluşturduğu ve eğer 4 OY_c ye eşit veya daha büyükse güçlü (+++) biyofilm oluşturduğu düşünüldü (116).

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 programı ile gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama±standart sapma ve medyan (min-maks) değerleri kullanıldı. Kategorik değişkenler sunulurken değişkenlerin frekans ve yüzde değerleri kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiler varsayımlar sağlandığında Pearson Ki-kare Testi ile; varsayımlar sağlanmadığında Freeman-Halton Test (Fisher’s Exact Test) ile incelendi. Nicel değişkenler bakımından bağımsız iki grup arasında fark olup olmadığı parametrik test varsayımlarının

sağlanmadığı durumda Mann Whitney U Testi ile belirlendi. p-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. İzolatların Epidemiyolojik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 45 *E. faecalis* izolatının hasta cinsiyetine göre dağılımına bakıldığında 31 erkek (%68,9) ve 14 kadın (%31,1) şeklinde bir dağılım gözlenmiş, oranlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.011$). Merkezlere göre dağılım detaylandırılacak olursa Merkez 1’de dağılım %80 erkek, %20 kadın; Merkez 2’de %60 erkek, %40 kadın ve Merkez 3’te %66,7 erkek, %33,3 kadın şeklindedir.

Toplanan 45 *E. faecalis* izolatının tümü hesaplama alındığında ortalama hasta yaşı 56,4 iken yaş aralığı ise 0-92’dir. Kadın hastalardan izole edilen *E. faecalis* izolatlarında hasta yaşı ortalama 50,1 ve yaş aralığı 0-92 iken, erkeklerde ortalama 59,3 ve aralık 0-90 şeklindedir. Merkezlere göre ortalama yaş ve yaş dağılımı verileri Tablo 4.1’de detaylandırılmıştır.

Tablo 4.1. Merkezlere göre ortalama yaş ve yaş aralığı verileri

	Yaş Aralığı	Ortalama Yaş
<i>E. faecalis</i>		
Merkez 1	0-90	62,5
Merkez 2	0-92	56,1
Merkez 3	0-84	50,8
<i>E. faecium</i>		
Merkez 1	6-86	59,7
Merkez 2	1-81	54,2
Merkez 3	1-98	51,7

E. faecalis izolatları, izole edikleri hastaların bulunduğu klinikler açısından değerlendirilecek olursa; 9 izolat (%20) cerrahi branşlardan 36 izolat (%80) ise dahili branşlardan elde edilmiştir. İzolatların hangi servislerdeki hastalardan izole edildiği Tablo 4.2’de detaylandırılmıştır.

Tablo 4.2. İzolatların elde edildiği klinikler

Klinik Branşlar	<i>E. faecalis</i> (n=45) n (%)	<i>E. faecium</i> (n=45) n (%)
Kardiyovasküler Cerrahi	4 (%8,9)	6 (%13,3)
Genel Cerrahi	2 (%4,4)	6 (%13,3)
Kadın Hastalıkları ve Doğum	0 (%0)	3 (%6,7)
Beyin ve Sinir Cerrahisi	1 (%2,2)	1 (%2,2)
Üroloji	2 (%4,4)	0 (%0)
Nefroloji	10 (%22,2)	2 (%4,4)
Onkoloji	5 (%11,1)	10 (%22,2)
Kardiyoloji	5 (%11,1)	2 (%4,4)
Göğüs Hastalıkları	2 (%4,4)	3 (%6,7)
Enfeksiyon Hastalıkları	2 (%4,4)	0 (%0)
Gastroenteroloji	2 (%4,4)	3 (%6,7)
Nöroloji	4 (%8,9)	4 (%8,9)
Geriatri	1 (%2,2)	0 (%0)
Anestezi	0 (%0)	1 (%2,2)
Pediyatri	5 (%11,1)	4 (%8,9)

E. faecium kökenlerinin izole edildiği hastalar için cinsiyet dağılımı değerlendirildiğinde 45 izolatın 21'i (%46,7) erkek 24'ü (%53,3) ise kadın hastalardan elde edilmiş olup oranlar arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı değildir ($p=0.655$). Merkezlere göre dağılım incelenecek olursa Merkez 1'de hastaların %66,7'si kadın, %33,3'ü erkek; Merkez 2'de %53,3'ü kadın, %46,7'si erkek ve Merkez 3'te %40'ı kadın, %60'ı erkek şeklindedir.

Toplanan 45 *E. faecium* izolatının tümü hesaplamaya alındığında ortalama hasta yaşı 55,2 iken yaş aralığı ise 0-98'dir. Kadın hastalardan elde edilen *E. faecium* izolatlarında ortalama hasta yaşı 54,9 ve yaş aralığı 1-98; erkeklerde ortalama 55,5 ve aralık 0-90 şeklindedir. Merkezlere göre ortalama yaş ve yaş dağılımı ilgili tabloda (Bkz. Tablo 4.1) detaylandırılmıştır.

Cinsiyet dağılımı açısından iki bakteri türü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. *E. faecalis* izolatları *E. faecium* izolatlarına oranla erkek hastalardan istatistiksel olarak anlamlı biçimde ($p=0.033$) daha sık izole edilmiştir. Her iki bakteri grubunda da yaş ortalaması benzerdir ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Yaş kıyaslamasında Mann-Whitney U testi cinsiyet kıyaslamasında ise Pearson Ki-kare testi kullanılmıştır.

E. faecium izolatları, izole edikleri hastaların bulunduğu klinikler açısından değerlendirilecek olursa 16 izolat (%35,6) cerrahi branşlardan, 29 izolat (%64,4) ise dahili branşlardan elde edilmiştir. İzolatların hangi servisteki hastalardan izole edildiği ilgili tabloda (Bkz. Tablo 4.2) detaylandırılmıştır.

İzolatların elde edildikleri branşlar cerrahi ve dahili olarak sınıflandırılıp türler arası farklılıklar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemekle ($p=0.099$) birlikte *E. faecium* izolatları *E. faecalis* izolatlarına göre cerrahi branşlardan -sırasıyla %35,6 ve %20- ve *E. faecalis* izolatları *E. faecium* izolatlarına göre dahili branşlardan -sırasıyla %80 ve %64,4- daha yüksek sıklıkta elde edilmişlerdir. Branşlar açısından kıyaslama Pearson Ki-kare testi ile yapılmıştır.

Tür ve merkez ayrımı yapılmaksızın değerlendirildiğinde tüm enterokok izolatlarının %57,8'i erkek hastalardan ve %42,2'si kadın hastalardan elde edilmiş olup aradaki fark ($p=0.14$) istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kadın hastalardan elde edilen 38 enterokok izolatı için ortalama hasta yaşı 53,1 ve yaş aralığı 0-98 iken erkeklerden elde edilen 52 enterokok izolatı için bu değerler sırasıyla 57,8 ve 0-90 şeklindedir. Tüm izolatların 65'i (%72,2) dahili branşlardan elde edilirken 25'i (%27,8) cerrahi branşlardan elde edilmiştir. Dağılım incelendiğinde cerrahi branşlar içinde en sık kardiyovasküler cerrahi (%40) ve genel cerrahi (%32) den elde edilen izolatlarla karşılaşılırken dahili branşlar içinde ise onkoloji (%23,1), nefroloji (%18,5) ve pediatri (%13,9) başı çekmektedir.

4.1.2. Ortalama Kan Kültürü Sinyal Pozitifliği Süreleri

Merkez fark etmeksizin yapılan hesaplamalarda *E. faecalis* izolatları için ortalama kan kültürü sinyal pozitifliği süresi 31 saat 36 dakika (1896 dk) iken *E. faecium* izolatları için bu süre 29 saat 33 dakika (1773 dk) olarak tespit edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak ($p=0.701$) anlamlı değildir. Kıyaslama Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Kan kültürü sinyal pozitifliği süreleri ile ilgili bilgiler Tablo 4.3'te detaylandırılmıştır.

Tablo 4.3. Kan kültürü sinyal pozitifliği süreleri

	<i>E. faecalis</i> (n=30)	<i>E. faecium</i> (n=30)
Ortalama Pozitifleşme Süresi	1896 dakika (31 saat 36 dakika)	1773 dakika (29 saat 33 dakika)
En Kısa Pozitifleşme Süresi	483 dakika (8 saat 3 dakika)	374 dakika (6 saat 14 dakika)
En Uzun Pozitifleşme Süresi	5610 dakika (93 saat 30 dakika)	5802 dakika (96 saat 42 dakika)

4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

Her 3 merkezden elde edilen izolatların ampisilin, imipenem, siprofloksasin, vankomisin, teikoplanin, tetrasiklin, eravasiklin, kinupristin-dalfopristin (*E. faecium* için), linezolid, gentamisin (yüksek düzey direnci değerlendirmede) ve streptomisin (yüksek düzey direnci değerlendirmede) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Tetrasiklin haricindeki antibiyotiklere duyarlılık sonuçları EUCAST kriterlerine göre (76), tetrasiklin duyarlılık sonucu ise EUCAST rehberinde sınır değerler bulunmadığı için CLSI kriterlerine göre (77) değerlendirilmiştir.

Duyarlılık profillerinin tespiti için yapılan çalışmalar sonucunda; hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* izolatlarına karşı en yüksek etkinlik gösteren antibiyotik linezolid (duyarlılık oranı %100) olarak tespit edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarında en düşük duyarlılık gözlenen antibiyotik tetrasiklin iken (%28,9) *E. faecium* izolatlarında ise -intrensek ampisilin ve imipenem direnci dışlanacak olursa- en az duyarlılık gözlenen antibiyotik (%8,9) siprofloksasin olarak değerlendirilmiştir.

Tüm *E. faecalis* izolatları hesaplamalara alındığında vankomisin ve teikoplanin duyarlılık oranları her iki antibiyotik için de %100 iken, YDGD tarama sonucu negatif izolat oranı %75,5 ve YDSD tarama sonucu negatif izolat oranı %73,3 olarak gözlenmiştir. Tüm *E. faecium* izolatları göz önüne alındığında vankomisin ve teikoplanin duyarlılık oranları %68,9 iken, YDGD tarama sonucu negatif izolat oranı %33,3 ve YDSD tarama sonucu negatif izolat oranı %22,2 olarak saptanmıştır. Merkez fark etmeksizin yapılan değerlendirmede *E. faecalis* izolatlarında ampisilin, imipenem, vankomisin, teikoplanin ve siprofloksasin duyarlılık oranları *E. faecium* izolatlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. *E. faecalis* izolatları içerisinde YDGD ve YDSD göstermeyen izolat oranları da *E. faecium* izolatlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek

bulunmuştur. Eravasiklin duyarlılık oranları açısından ise iki tür arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. İlgili p değerleri Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Vankomisin ve teikoplanine dirençli bir *E. faecium* izolatının antibiyotik duyarlılık testi plaklarının fotoğrafları Şekil 4.1.'te verilmiştir. YDGD gösterip YDSD göstermeyen bir *E. faecalis* izolatının; YDSD gösterip YDGD göstermeyen bir *E. faecalis* izolatının ve her iki dirence de sahip bir *E. faecium* izolatının antibiyotik duyarlılık testi plaklarının fotoğrafları ise Şekil 4.2.'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Tüm izolatların antibiyotik duyarlılık oranları

	<i>E. faecalis</i> (n=45) n/(%)	<i>E. faecium</i> (n=45) n/(%)	Tüm İzolatlar (n=90) n/(%)	p değeri ****
Ampisilin	45 (%100)	0 (%0)	45 (%50)	<0.001
İmipenem*	45 (%100)	0 (%0)	45 (%50)	<0.001
Vankomisin	45 (%100)	31 (%68,9)	76 (%84,4)	<0.001
Teikoplanin	45 (%100)	31 (%68,9)	76 (%84,4)	<0.001
Siprofloksasin	35 (%77,8)	4 (%8,9)	39 (%43,3)	<0.001
Tetrasiklin***	13 (%28,9)	26 (%57,8)	39 (%43,3)	0.006
Eravasiklin	45 (%100)	43 (%95,5)	88 (%97,8)	0.494
Kinupristin/Dalfopristin	Test Edilmedi**	29 (%64,4)	29 (%64,4)	-
Gentamisin*****	34 (%75,5)	15 (%33,3)	49 (%54,4)	<0.001
Streptomisin*****	33 (%73,3)	10 (%22,2)	43 (%47,8)	<0.001
Linezolid	45 (%100)	45 (%100)	90 (%100)	-

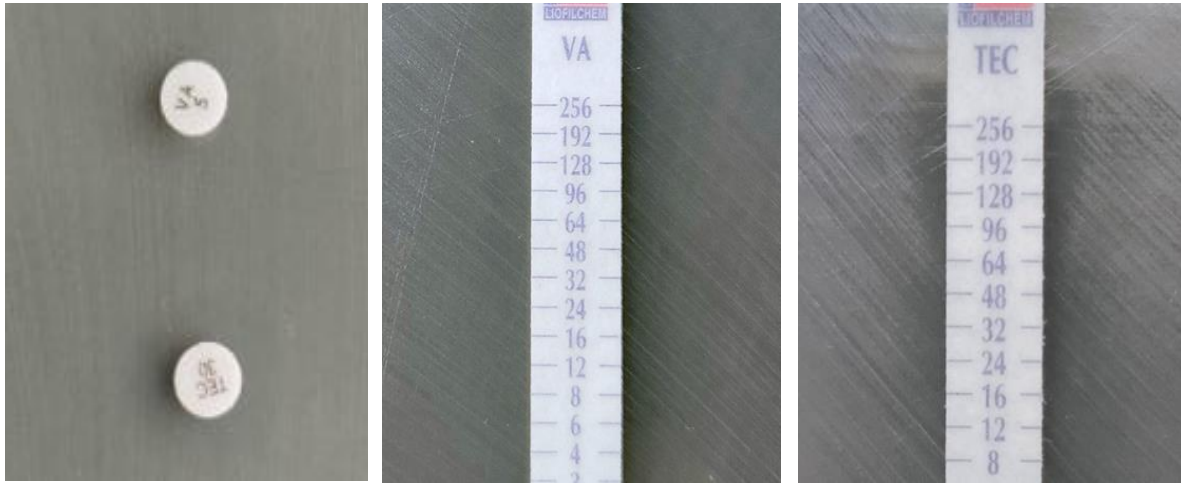
* Enterokoklar EUCAST önerileri doğrultusunda imipeneme karşı asla standart dozda duyarlı kabul edilmemesi gerektiğinden yüksek dozda duyarlı tespit edilen izolatların oranları verilmiştir.

** *E. faecalis* Kinupristin/Dalfopristin'e intrinsek dirençli olduğu için test edilmemiştir.

*** EUCAST kriterlerine göre değerlendirilen diğer antibiyotiklerin aksine CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

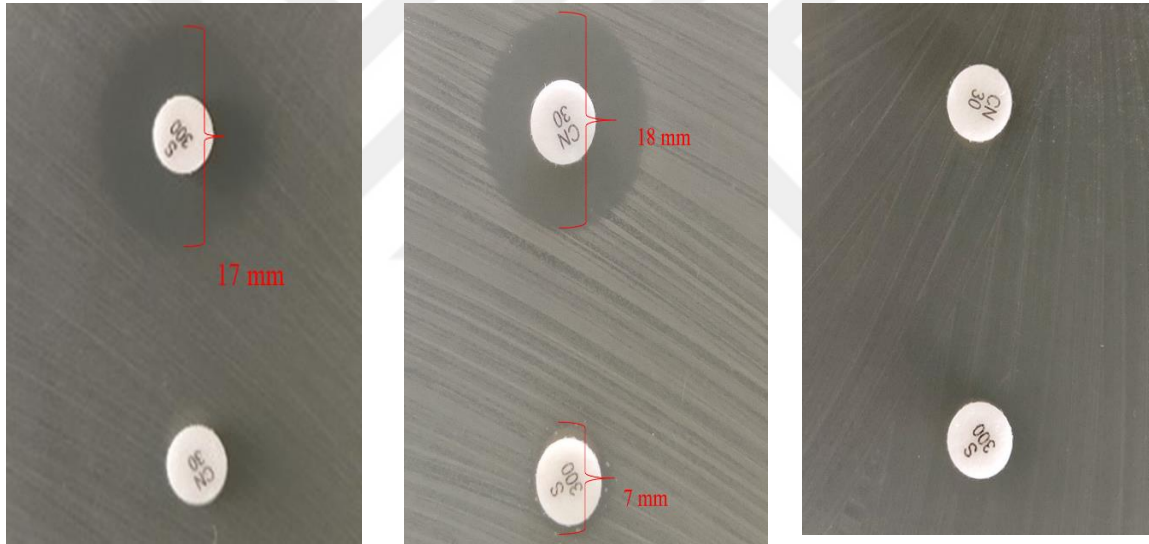
**** p değerleri *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının duyarlılık sonuçlarının kıyaslanması sonucu Pearson Ki-Kare testi ile elde edilmiştir.

***** Yüksek düzey direnç gözlenmeyen izolatların oranı verilmiştir.



Şekil 4.1. Vankomisin ve teikoplanin dirençli bir *E. faecium* izolatının antibiyotik duyarlılık testi plakları

* Vankomisin MİK değeri >256 mg/L ve Teikoplanin MİK değeri 64 mg/L olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Üç farklı yüksek düzey aminoglikozit direnç paterninin gözlemlendiği antibiyotik duyarlılık testi plakları

* Soldan ilk fotoğraf YDGD gösterip YDSD göstermeyen bir Merkez 1 *E. faecalis* izolatının fotoğrafıdır.

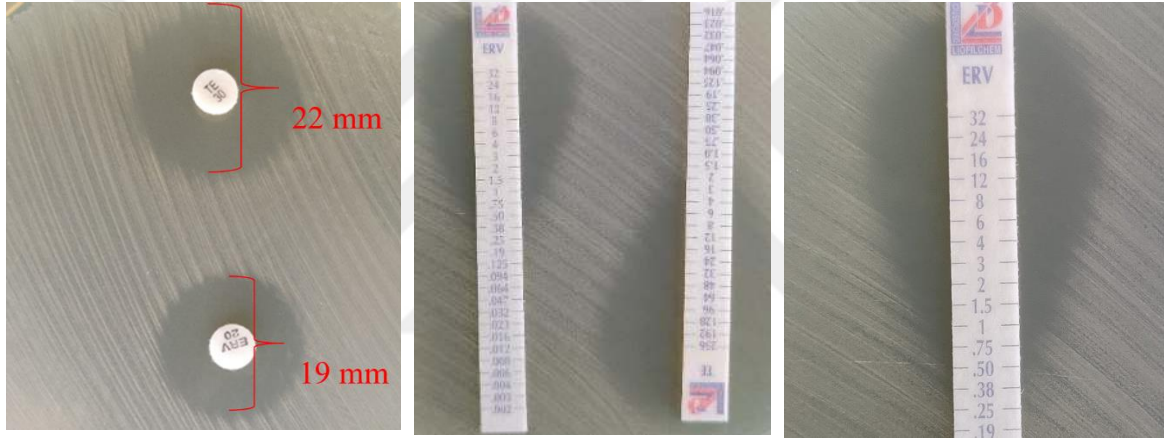
** Ortada ki fotoğraf YDSD gösterip YDGD göstermeyen bir Merkez 3 *E. faecalis* izolatının fotoğrafıdır.

*** Sağdan ilk fotoğraf hem YDGD hem de YDSD gösteren bir Merkez 3 *E. faecium* izolatının fotoğrafıdır.

Toplam 45 *E. faecalis* izolatından 2'si için disk difüzyon yöntemiyle yüksek düzey gentamisin direnci varlığından emin olunamayıp bu izolatlar gradiyent difüzyon yöntemi ile doğrulanmış ve yüksek düzey dirence sahip olmadıkları belirlenmiştir. Yine 45 *E. faecium* izolatından 2'sinde disk difüzyon yöntemiyle yüksek düzey gentamisin direnci varlığından şüphe edilmiş gradiyent difüzyon yöntemi ile bunlardan 1'i duyarlı diğeri ise dirençli

kategorisinde değerlendirilmiştir. Yüksek düzey streptomisin direnci tespitinde ise disk difüzyon yöntemi ile şüphe oluşan toplam 4 izolat olup bunların 4'ü de gradiyent difüzyon yöntemi ile yüksek düzey dirençli olarak tespit edilen *E. faecium* izolatlarıdır.

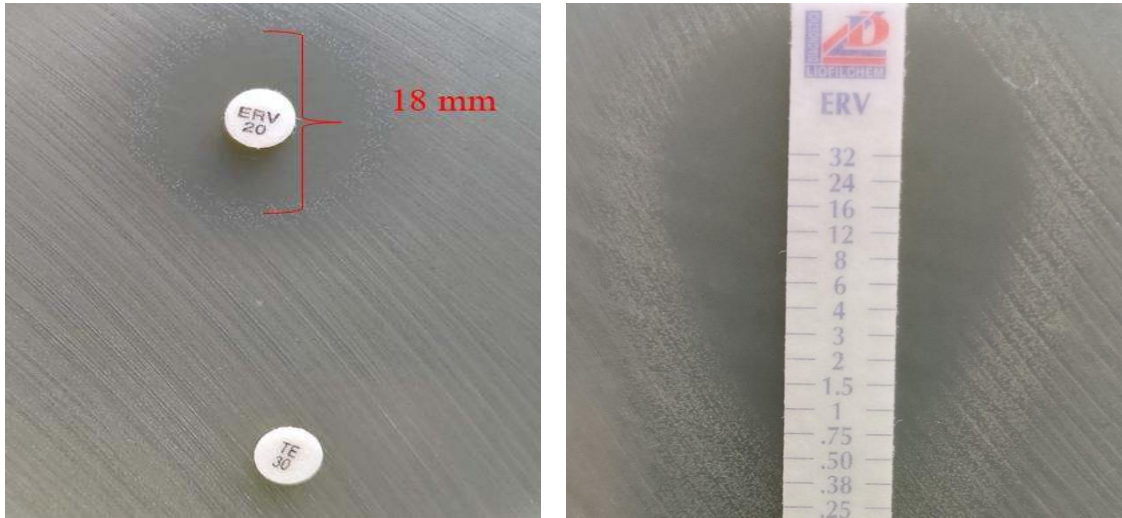
Ülkemizde konuyla ilgili literatür eksikliğinden ve global literatürde de direncin nadir olduğunun bildirilmiş olmasından ötürü disk difüzyon yöntemiyle eravasikline dirençli olarak gözlenen 2 adet izolatta (2'si de *E. faecium*) eravasiklin direnci gradiyent difüzyon testi ile doğrulanmıştır. Eravasikline dirençli izolatların birisi disk difüzyon testi ile tetrasikline duyarlı bulunmuş, bu izolatın tetrasikline duyarlı olduğu gradiyent difüzyon testi ile de doğrulanmıştır. Diğer izolat tetrasikline de dirençli bulunmuştur. Bu izolatların eravasiklin ve tetrasiklin duyarlılık testlerine ilişkin fotoğraflar Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Eravasiklin dirençli (EUCAST'e göre), tetrasiklin duyarlı (CLSI'a göre) izolatın antibiyotik duyarlılık testi plakları

* Eravasiklin MİK değeri 0,5 mg/L ve Tetrasiklin MİK değeri 3 mg/L olarak gözlenmiştir.

** Sağdan ilk fotoğraf, ortadaki fotoğraftaki eravasiklin stripinin yakınlaştırılmış halidir.



Şekil 4.4. Hem eravasiklin (EUCAST'e göre) hem de tetrasikline (CLSI'a göre) dirençli izolatın antibiyotik duyarlılık testi plakları

* Eravasiklin MİK değeri 0,75 mg/L olarak gözlenmiştir.

CLSI'a göre tetrasikline duyarlı izolatların %2,6'sı (1/39) EUCAST'e göre eravasikline dirençli gözlenmişken; CLSI'a göre tetrasikline dirençli veya orta duyarlı izolatların %98,1'i (50/51) EUCAST'e göre eravasikline duyarlı olarak gözlenmiştir.

Glikopeptit direnci gösteren izolatların %92,9'unda in vitro eravasiklin duyarlılığı gözlenmiştir. Eravasiklin direnci gösteren izolatlardan biri Merkez-2 diğeri ise Merkez 3'te izole edilmiş olup her ikisi de *E. faecium* izolatıdır. Merkez-2 izolatında glikopeptitler, tetrasiklin ve linezolid haricindeki antibiyotiklere direnç mevcut bulunmuşken; Merkez-3 izolatında ise linezolid hariç tüm antibiyotiklere karşı direnç mevcut bulunmuştur.

E. faecium izolatlarında gentamisine karşı gösterilen direncin düzeyi açısından merkezler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir ($p=0.003$). Merkez-1'de YDGD tarama sonucu negatif izolat oranı %66,7 iken, bu oran Merkez-2'de %20 (Merkez-1 ve 2 arasında $p=0.030$) ve Merkez-3'te %13,33 (Merkez-1 ve 3 arasında $p=0.009$) olarak tespit edilmiş ve Merkez-1'de YDGD gözlenmeyen izolat oranının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. *E. faecium* izolatlarında YDSD gözlenmeyen izolat oranı açısından da merkezler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir (Merkez-1 ve Merkez-3 arasında $p=0.021$). Merkez-1'de YDSD tarama sonucu negatif izolat oranı %40 olarak saptanırken, bu oran Merkez-2'de %26,7 ve Merkez-3'te ise %0 olarak gözlenmiştir. Merkez-1'de YDSD gözlenmeyen izolat oranı Merkez-3'e kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Merkez-1 ve Merkez-2'de *E. faecalis* izolatlarının sadece %13,3'ü hem YDGD hem de YDSD gösterirken bu oran Merkez-3'ten izole edilen *E. faecalis* izolatlarında

ise %20 olarak gözlenmiştir. Merkez-1’de *E. faecium* izolatlarının %20’si hem YDGD hem de YDSD gösterirken bu oran Merkez-2 *E. faecium* izolatlarında %40 ve Merkez-3 *E. faecium* izolatlarında ise %86,7 olarak gözlenmiştir. Merkezlere göre antibiyotik duyarlılık kıyaslamaları için yapılan değerlendirmeler (sırasıyla *E. faecium* ve *E. faecalis* için) Tablo 4.5 ve 4.6’da sunulmuştur.

Tablo 4.5. Merkezlere göre *E. faecium* izolatlarının antibiyotik duyarlılık oranları

	Duyarlı <i>E. faecium</i> izolatı sayısı n(%)				
	Merkez-1	Merkez-2	Merkez-3	Total	p değeri **
Ampisilin	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	-
İmipenem	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	-
Vankomisin	13 (%86,7)	10 (%66,7)	8 (%53,3)	31 (%68,9)	0.174
Teikoplanin	13 (%86,7)	10 (%66,7)	8 (%53,3)	31 (%68,9)	0.174
Siprofloksasin	3 (%20)	0 (%0)	1 (%6,7)	4 (%8,9)	0.302
Tetrasiklin*	6 (%40)	11 (%73,3)	10 (%66,7)	27 (%60)	0.177
Eravasiklin	15 (%100)	14 (%93,3)	14 (%93,3)	43 (%95,6)	1.000
Kinupristin- Dalfopristin	8 (%53,3)	10 (%66,7)	11 (%73,3)	29 (%64,4)	0.507
Gentamisin***	10 (%66,7)	3 (%20)	2 (%13,3)	15 (%33,3)	0.003
Streptomisin***	6 (%40)	4 (%26,7)	0 (%0)	10 (%22,2)	0.021****
Linezolid	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-

* EUCAST kriterlerine göre değerlendirilen diğer antibiyotiklerin aksine CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

** p değerleri merkezler arasında ki antibiyotik duyarlılık sonuçlarının kıyaslanması sonucu Fisher’s Exact testi ile elde edilmiştir.

*** Yüksek düzey direnç göstermeyen izolatların oranı verilmiştir.

**** Bu değer Merkez-1 ile Merkez-3 arasındaki farkı yansıtmaktadır.

Tablo 4.6. Merkezlere göre *E. faecalis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık oranları

	Duyarlı <i>E. faecalis</i> izolatı sayısı n (%)				p değeri ****
	Merkez-1	Merkez-2	Merkez-3	Total	
Ampisilin	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-
İmipenem*	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-
Vankomisin	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-
Teikoplanin	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-
Siprofloksasin	11 (%73,3)	11 (%73,3)	13 (%86,7)	35 (%77,8)	0.734
Tetrasiklin***	4 (%26,7)	5 (%33,3)	4 (%26,7)	13 (%28,9)	1.000
Eravasiklin	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-
Kinupristin-Dalfopristin**	-	-	-	-	-
Gentamisin*****	10 (%66,7)	13 (%86,7)	11 (%73,3)	34 (%75,6)	0.566
Streptomisin*****	12 (%80)	11 (%73,3)	10 (%66,6)	33 (%73,3)	0.912
Linezolid	15 (%100)	15 (%100)	15 (%100)	45 (%100)	-

* Enterokoklar, EUCAST önerileri doğrultusunda imipeneme karşı asla standart dozda duyarlı kabul edilmemesi gerektiğinden yüksek dozda duyarlı tespit edilen izolatların oranı verilmiştir.

** *E. faecalis* Kinupristin/Dalfopristin'e intrinsek dirençli olduğu için test edilmemiştir.

*** EUCAST kriterlerine göre değerlendirilen diğer antibiyotiklerin aksine CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

**** p değerleri iki tür arasındaki antibiyotik duyarlılık sonuçlarının kıyaslanması sonucu Pearson Ki-Kare testi ile elde edilmiştir.

***** Yüksek düzey direnç gözlenmeyen izolatların oranı verilmiştir.

Vankomisin direnci gösteren 14 (%31,1) *E. faecium* izolatıyla vankomisine duyarlı 31 (%68,9) *E. faecium* izolatının diğer antimikrobiyallere duyarlılıkları kıyaslanmıştır. Vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarında, vankomisine duyarlı *E. faecium* izolatlarına kıyasla kinupristin-dalfopristine ve tetrasikline karşı daha yüksek duyarlılık oranları gözlenirken; diğer antibiyotiklere karşı vankomisine duyarlı *E. faecium* izolatlarında daha yüksek duyarlılık oranları gözlenmiştir. Bu duyarlılık farklılıklarından istatistiksel olarak anlamlı olanlar yüksek düzey gentamisin ($p=0.016$) ve teikoplanin ($p<0.0001$) için olanlardır. Vankomisine dirençli ve vankomisine duyarlı *E. faecium* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Vankomisine dirençli *E. faecium* izolatları ile vankomisine duyarlı *E. faecium* izolatlarının antibiyotik duyarlılık kıyaslaması

	Vankomisine Dirençli <i>E. faecium</i> n (%)	Vankomisine Duyarlı <i>E. faecium</i> n (%)	p değeri **
Ampisilin	0 (%0)	0 (%0)	-
İmipenem	0 (%0)	0 (%0)	-
Teikoplanin	0 (%0)	31 (%100)	<0.0001
Siprofloksasin	0 (%0)	3 (%9,7)	0.541
Tetrasiklin*	10 (%71,4)	16 (%51,6)	0.329
Eravasiklin	13 (%92,9)	30 (%96,8)	0.530
Kinupristin- Dalfopristin	10 (%71,4)	19 (%61,3)	0.737
Streptomisin***	1 (%7,1)	9 (%29,1)	0.137
Gentamisin***	1 (%7,1)	14 (%45,1)	0.016
Linezolid	14 (%100)	31 (%100)	-

* Tetrasiklin duyarlılığı CLSI'a göre kalan antimikrobiyal duyarlılıkları ise EUCAST'e göre belirlenmiştir.

** p değerleri vankomisin duyarlılığına göre ayrılan iki grubun diğer antimikrobiyaller duyarlılık oranlarının Fisher's Exact testi ile kıyaslanması sonucu bulunmuştur.

*** Yüksek düzey direnç gözlenmeyen izolatların oranı verilmiştir.

Bir izolatta beta-laktam, glikopeptit ve aminoglikozit antibiyotiklerden herhangi birine direnç olmaması durumunda beta-laktam-aminoglikozit ve glikopeptit-aminoglikozit sinerjisi beklenmektedir (3). Beta-laktam veya glikopeptit yapıdaki antimikrobiyallerle aminoglikozitlerin sinerjisi değerlendirildiğinde 45 *E. faecalis* izolatında; 34 izolat (%75,5) için beta laktam-gentamisin sinerjisi, 33 izolat (%73,3) için ise beta laktam-streptomisin sinerjisi beklenmektedir. Bu 45 izolatta hiçbir izolatın glikopeptit direnci göstermemesinden ötürü glikopeptitlerle olan sinerji yüzdeleri de aynıdır.

Beta-laktam veya glikopeptit yapıdaki antimikrobiyallerle aminoglikozitlerin sinerjisi 45 *E. faecium* izolatu için değerlendirildiğinde; hiçbir izolat için beta-laktam- aminoglikozit (hem gentamisin hem de streptomisin) sinerjisi beklenmemekte, glikopeptit-gentamisin sinerjisi 14 izolatta (%31,1) ve glikopeptit-streptomisin sinerjisi ise 9 izolatta (%20) beklenmektedir.

Bu oranlar tür ayrımı yapmaksızın 90 izolatın tamamı için değerlendirildiğinde; ampisilin ve gentamisin sinerjisi %37,8, ampisilin ve streptomisin sinerjisi %36,7, vankomisin ve gentamisin sinerjisi %53,3, vankomisin ve streptomisin sinerjisi %46,7 şeklinde

bulunmuştur. Hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* için sinerji verileri merkez bazında tablo 4.8.'de detaylandırılmıştır.

Tablo 4.8. Merkez bazında, görülmesi beklenen sinerjistik etkileşim oranları

	Ampisilin-Gentamisin n(%)	Ampisilin-Streptomisin n(%)	Vankomisin-Gentamisin n(%)	Vankomisin-Streptomisin n(%)
Merkez 1 <i>E. faecalis</i>	10 (%66,6)	12 (%80)	10 (%66,6)	12 (%80)
Merkez 1 <i>E. faecium</i>	0 (%0)	0 (%0)	10 (%66,6)	6 (%40)
Merkez 2 <i>E. faecalis</i>	13 (%86,7)	11 (%73,3)	13 (%86,7)	11 (%73,3)
Merkez 2 <i>E. faecium</i>	0 (%0)	0 (%0)	2 (%13,3)	3 (%20)
Merkez 3 <i>E. faecalis</i>	11 (%73,3)	10 (%66,6)	11 (%73,3)	10 (%66,6)
Merkez 3 <i>E. faecium</i>	0 (%0)	0 (%0)	2 (%13,3)	0 (%0)
Toplam <i>E. faecalis</i>	34 (%75,5)	33 (%73,3)	34 (%75,5)	33 (%73,3)
Toplam <i>E. faecium</i>	0 (%0)	0 (%0)	14 (%31,1)	9 (%20)
Tüm İzolatlar	34 (%37,8)	33 (%36,7)	48 (%53,3)	42 (%46,7)

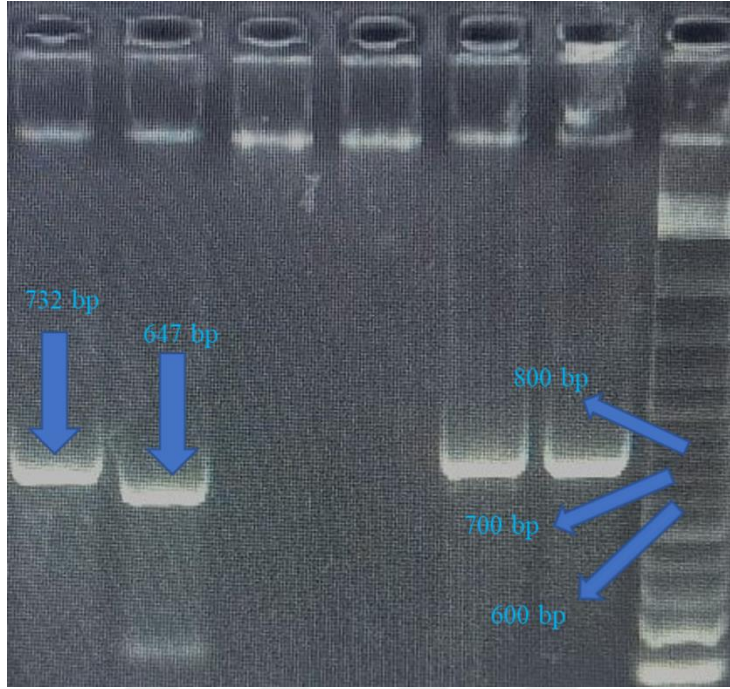
4.3. Antibiyotik Direnç Genleri

Yapılan literatür taramaları eşliğinde fenotipik olarak (disk difüzyon yöntemiyle) vankomisin direnci olan veya inhibisyon zonunun kenarında keskinlik olmadığı için direnç şüphesi olan toplam 55 izolat *vanA* ve *vanB* genleri açısından, fenotipik olarak (disk difüzyon veya gradient difüzyon yöntemiyle) yüksek düzey gentamisin direnci gösteren toplam 41 izolat *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* açısından ve fenotipik olarak (disk difüzyon veya gradient difüzyon yöntemiyle) yüksek düzey streptomisin direnci gösteren toplam 47 izolat *ant(3'')-Ia* ve *ant(6')-Ia* açısından konvansiyonel PZR ile değerlendirilmiştir.

4.3.1. Direnç Genleri Dağılımı

Vankomisin direnci açısından PZR çalışılan 55 izolatın 12'si (%21,8) *E. faecalis* iken 43'ü (%78,2) *E. faecium* izolatıydı. 12 *E. faecalis* izolatının tamamı (%100) ile *E. faecium* izolatlarının 29'u (%67,4) inhibisyon zonunun kenarında keskinlik olmadığı için direnç şüphesiyle PZR çalışmasına dahil edilmiştir ve bu izolatların hiçbirisinde herhangi bir direnç geni tespit edilememiştir. Kalan 14 adet *E. faecium* izolatı ise fenotipik olarak hem vankomisin hem de teikoplanine dirençli gözlendiği için PZR çalışmasına dahil edilmişti ve bu izolatların tümünde (%100) *vanA* direnç geni saptanmıştır. Hiçbir izolatta (%0) *vanB*

direnç geni tespit edilmemiştir. Glikopeptit direncinin genotipik tespiti için yapılmış bir PZR testinin jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.5.'te verilmiştir.

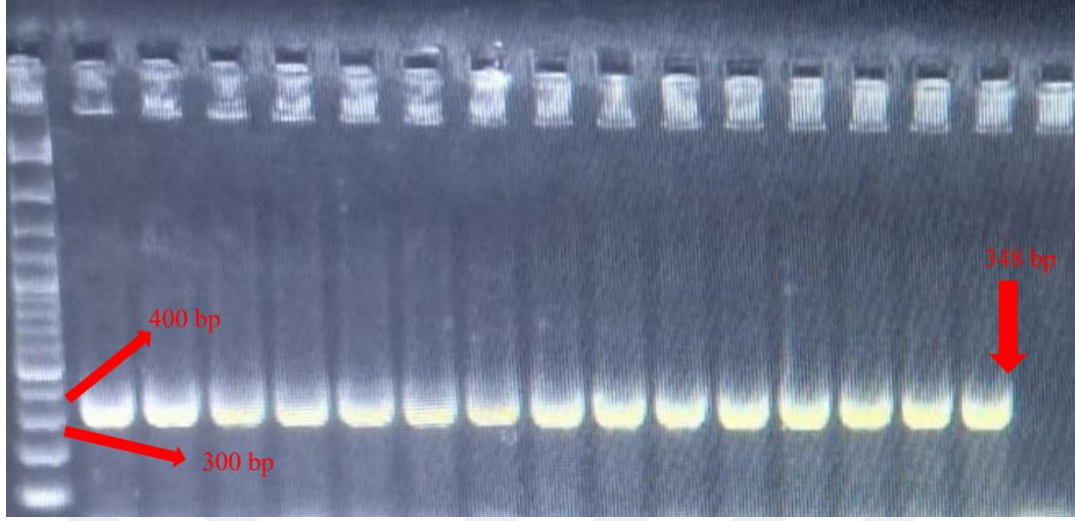


Şekil 4.5. Glikopeptit direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması

* Soldan ilk kuyucukta *vanA* geni pozitif kontrol izolatının PZR ürünü jel elektroforezde yürütülmüşken onun yanındaki kuyucukta *vanB* geni pozitif kontrol izolatının PZR ürünü jel elektroforezde yürütülmüştür. Sağdan ilk kuyucuk 100 bp'lik ladder kuyucuğu iken sağdan ikinci ve üçüncü kuyucuklarda ise *vanA* geni pozitif iki klinik izolatın jel elektroforez görüntüsü görünmektedir. Sağdan 4. kuyucukta glikopeptit direnç geni negatif bir izolatın PZR ürününün ve onun solunda ki kuyucukta ise negatif kontrol örneğinin PZR ürününün jel elektroforez görüntüsü gözlenmektedir.

Yüksek düzey gentamisin direnci açısından PZR ile direnç geni araştırılan izolatların 40'ında (%97,6) direnç disk difüzyon yöntemi ile belirlenmişken 1'inde (%2,4) gradiyent difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. PZR çalışmasına dahil edilen izolatların 11'i (%26,8) *E. faecalis* 30'u (%73,2) ise *E. faecium* izolatıdır . Bu 41 izolatın 38'inde (%92,7) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni tespit edilmişken *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* geni pozitifliğine hiçbir izolatta (%0) rastlanılmamıştır. Fenotipik olarak dirençli saptanan 3 izolatta (2'si *E. faecalis* ve 1'i *E. faecium*) ise araştırılan hiçbir direnç geninin pozitifliği gözlenmemiştir. Gentamisin

direncinin genotipik tespiti için yapılmış bir PZR testinin jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.6’da verilmiştir.

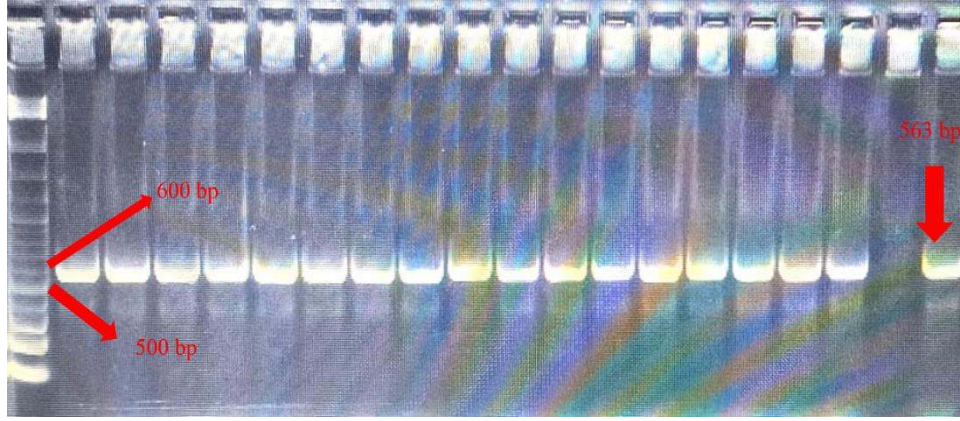


Şekil 4.6. Yüksek düzey gentamisin direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması

* Sağdan ilk kuyucuk jel elektroforez için negatif kontrol PZR ürününün yüklendiği kuyucukken ondan bir önceki kuyucuk ise pozitif kontrol PZR ürününün yüklendiği kuyucuktur. Kalan tüm kuyucuklarda ise *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni açısından pozitiflik gösteren klinik izolatların PZR ürünleri bulunmaktadır.

Yüksek düzey streptomisin direnci bakımından PZR ile direnç geni araştırılan izolatların 43’ünde (%91,5) direnç disk difüzyon yöntemi ile belirlenmişken 4’ünde (%8,5) gradiyent difüzyon yöntemi ile belirlenebilmiştir. Moleküler incelemeye alınan izolatların 12’si (%25,5) *E. faecalis* iken kalan 35’i (%74,5) *E. faecium* izolatı olarak tespit edilmiştir. Bu 47 izolatın 45’inde (%95,7) *ant(6')-Ia* geni tespit edilmişken izolatların hiçbirinde (%0) *ant(3'')-Ia* genine rastlanılmamıştır.

İki izolatla ise (1’i *E. faecalis* ve 1’i *E. faecium*) direnç için taranılan hiçbir gende pozitiflik gözlenmemiştir. Yüksek düzey streptomisin direncinin genotipik tespiti için yapılmış bir PZR testinin jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.7.’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Yüksek düzey streptomisin direncinin genotipik yöntemlerle araştırılması

* Sağdan ilk kuyucuk jel elektroforez için pozitif kontrol PZR ürününün yüklendiği kuyucukken ondan bir önceki kuyucuk ise negatif kontrolün PZR ürününün yüklendiği kuyucuktur. Kalan tüm kuyucuklarda ise *ant(6')-Ia* geni açısından pozitiflik gösteren klinik izolatların PZR ürünleri bulunmaktadır.

Direnç genlerinin tür ve merkezlere göre dağılımı Tablo 4.9.' da detaylandırılmıştır.

Tablo 4.9. Merkezlere göre direnç geni dağılımları

	Merkez-1		Merkez-2		Merkez-3	
	a*	b*	a*	b*	a*	b*
<i>vanA</i>	%0	%13,3	%0	%33,3	%0	%46,7
<i>vanB</i>	%0	%0	%0	%0	%0	%0
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	%26,7	%26,7	%13,3	%80	%20	%86,7
<i>aph(2'')-Ib</i>	%0	%0	%0	%0	%0	%0
<i>aph(2'')-Ic</i>	%0	%0	%0	%0	%0	%0
<i>aph(2'')-Id</i>	%0	%0	%0	%0	%0	%0
<i>ant(6')-Ia</i>	%20	%60	%20	%66,7	%33,3	%100
<i>ant(3'')-Ia</i>	%0	%0	%0	%0	%0	%0

*a ile yapılan kısaltma *E. faecalis*'i simgelerken b ile yapılan *E. faecium*'u simgelemektedir.

4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Profilleri

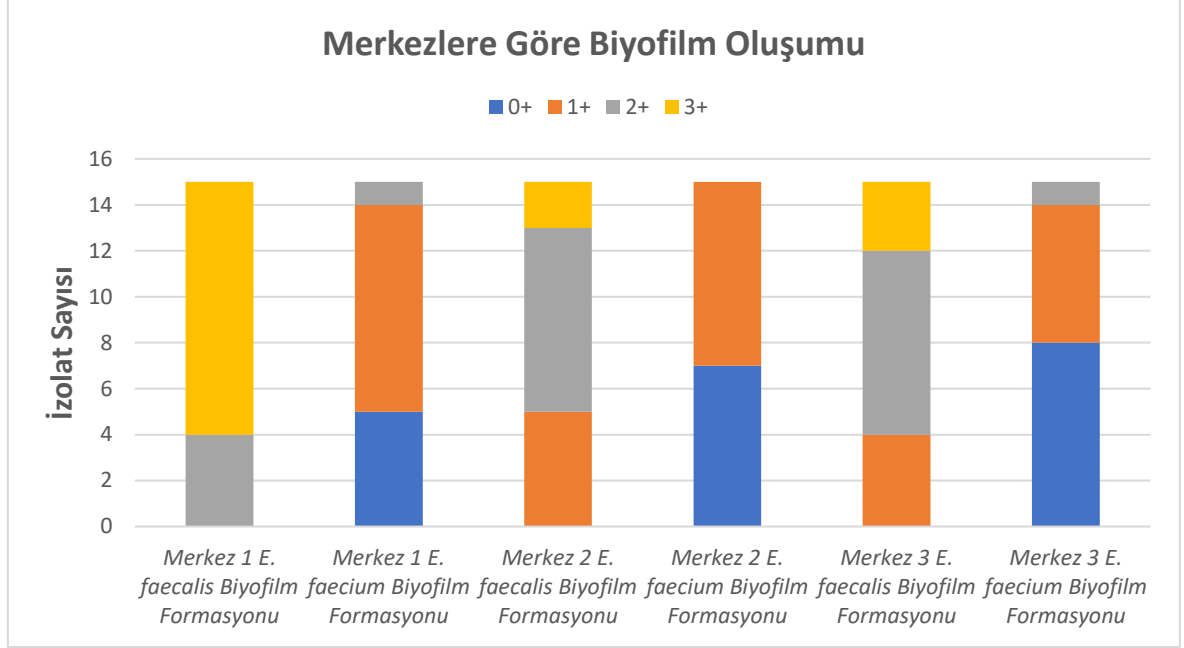
Merkez farkı gözetmeksizin yapılan incelemelerde 45 adet *E. faecalis* izolatının 20'sinde (%44,4) 2+ (orta) güçte biyofilm oluşumu görülmüş olup, izolatların 16'sında (%35,6) 3+ (güçlü) ve 9'unda (%20) 1+ (zayıf) güçte biyofilm oluşumu görür. *E. faecalis* izolatlarında biyofilm oluşumu göstermeyen (0+) herhangi bir izolata (%0) rastlanılmamıştır. Bazı

A 96-well microplate is shown, displaying a colorimetric assay. The top three rows of wells contain a purple color, indicating a positive result. The bottom three rows are empty. Yellow arrows point to the first three wells of each of the three rows containing purple color, labeled A through N.

**** D, E, H ve M ile gösterilen izolatlar *E. faecium* izolatları iken F, G, K, L ve N ile gösterilen izolatlar ise *E. faecalis* izolatlarıdır.

Tür ayrımı yapılmaksızın değerlendirme yapılacak olursa 90 enterokok izolatının 32'sinde (%35,6) 1+ (zayıf) biyofilm oluşumu gözlenirken 22'sinde 2+ (%24,4) (orta), 16'sında 3+

(%17,8) (güçlü) oluşum gözlenmiştir. İzolatların 20'sinde (%22,2) ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Merkezlere ve türlere göre formasyon Şekil 4.9.' da detaylandırılmıştır.



Şekil 4.9. Merkezlere ve türlere göre kantitatif biyofilm oluşumu

E. faecalis izolatlarında güçlü yapıda biyofilm oluşturma oranları açısından merkezler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık (Fisher's Exact testi ile) saptanmıştır ($p=0.001$). Merkez 1'de güçlü biyofilm oluşturan izolat oranı %73,3 olup, bu oran Merkez 2'deki %13,3 ($p=0.003$) ve Merkez 3'teki %20 ($p=0.010$) oranlardan anlamlı derecede yüksektir.

4.4.1. Antibiyotik Duyarlılık Profili ve Biyofilm Oluşumu İlişkisi

PZR ile direnç yol açan genleri taranan antimikrobiyallerde taranan genlerin dağılımı oldukça homojen kümelenme gösterdiği için direnç geni ve biyofilm formasyonu oluşumu incelemesi yapılmaksızın biyofilm oluşumu, fenotipik antimikrobiyal dirençle birlikte değerlendirilmiştir. Dolayısıyla fenotipik dirençte alınan sonuçlar dolaylı olarak vankomisin için *vanA*, yüksek düzey gentamisin için *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve streptomisin için *ant(6')-Ia* genleri ile ilişkilendirilebilir.

Glikopeptit dirençli 14 adet izolatta (tümü *vanA* pozitif *E. faecium*) biyofilm oluşturma gücü 7 izolat için 1+ (%50) (zayıf) iken kalan 7 izolat (%50) ise biyofilm oluşturmamıştır. Yüksek düzey gentamisin direnci gösteren 41 izolatın 16'sında (%39) biyofilm oluşumu gözlenmezken, 14'ünde (%34,1) 1+ (zayıf), 4'ünde (%9,8) 2+ (orta), 7'sinde (%17,1) güçlü biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Yüksek düzey streptomisin direnci gösteren 47 izolatın

15'inde (%31,9) biyofilm oluşumu gözlenmemişken, 20'sinde (%42,6) 1+ (zayıf), 7'sinde (%14,9) 2+ (orta) ve 5'inde (%10,6) 3+ (güçlü) biyofilm oluşumu izlenmiştir.

Tür bazında biyofilm formasyonu-antimikrobiyal duyarlılık ilişkisi Tablo 4.10.'da verilmiştir. Ampisilin ve imipeneme duyarlı izolatlar dolaylı olarak tüm *E. faecalis* izolatlarını, dirençli olan izolatlar ise tüm *E. faecium* izolatlarını temsil ettiği için bunlar incelemelere dahil edilmemişlerdir. Güçlü biyofilm oluşturan *E. faecalis* izolatlarında siprofloksasin direnci (%25), YDGD (%50) ve YDSD (%31,2) saptanan izolat oranı, orta ve zayıf biyofilm oluşturanlara göre yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte sadece güçlü biyofilm oluşturan izolatlardaki YDGD oranı (%50) ile orta düzeyde biyofilm oluşturanlardaki YDGD oranı (%10) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.023$). *E. faecium* için -istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte- siprofloksasin, kinupristin-dalfopristin ve YDGD direnç oranları orta güçte biyofilm oluşturan izolatlarda zayıf veya hiç oluşturmayanlara kıyasla daha yüksek görülmüştür.

Tablo 4.10. Tür bazında biyofilm formasyonu-antimikrobiyal duyarlılık ilişkisi

	<i>E. faecalis</i> (%)				<i>E. faecium</i> (%)			
	Güçlü (n=16)	Orta (n=20)	Zayıf (n=9)	p değeri	p değeri	Orta (n=2)	Zayıf (n=23)	Negatif (n=20)
Vankomisin	%100	%100	%100	-	1.000	%100	%69,6	%65
Teikoplanin	%100	%100	%100	-	1.000	%100	%69,6	%65
Siprofloksasin	%75	%80	%88,8	0.890	0.489	%0	%17,4	%5
Tetrasiklin	%31,3	%30	%22,2	0.911	0.052	%50	%47,8	%75
Eravasiklin	%100	%100	%100	-	0.535	%100	%91,3	%100
Kinupristin- Dalfopristin*	-	-	-	-	0.136	%50	%52,2	%80
Gentamisin****	%50	%90	%77,7	0.023	0.103	%0	%47,8	%20
Streptomisin****	%68,8	%70	%88,8	0.565	0.386	%50	%17,4	%25
Linezolid	%100	%100	%100	-	-	%100	%100	%100

* *E. faecalis* Kinupristin/Dalfopristin'e intrinsek dirençli olduğu için test edilmemiştir.

** Yüzdelere ilgili antimikrobiyale duyarlılık oranlarını göstermektedir.

*** p değerleri izolatların biyofilm oluşturma gücü kategorilerine göre antibiyotik duyarlılık sonuçlarının kıyaslanması sonucu Fisher's Exact testi ile elde edilmiştir.

**** Aminoglikozitler için yüksek düzey direnç gözlenmeyen izolatların oranı verilmiştir.

E. faecium için (orta güçte biyofilm oluşturan izolat sayısı düşüklüğü sebebiyle) orta ve zayıf güçte biyofilm oluşturan izolat grupları “biyofilm oluşturanlar” grubu altında birleştirilip, “biyofilm oluşturmeyenler” grubunun antibiyotik duyarlılıklarıyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemekle birlikte kinupristin-dalfopristin duyarlılıkları (biyofilm oluşturanlarda %52, oluşturmeyenlerde %80) arasındaki fark istatistiksel anlamlılık sınırına yakın bulunmuştur (p=0.051). *E. faecium* için biyofilm oluşturan ve biyofilm oluşturmeyen izolatların antibiyotik duyarlılık oranları ilişkisi Tablo 4.11.’de detaylandırılmıştır.

Tablo 4.11. *E. faecium* için biyofilm formasyonu-antibiyotik duyarlılık ilişkisi

	<i>E. faecium</i> % (n)*		
	Biyofilm Oluşturan (n=25)	Biyofilm Oluşturmeyen (n=20)	p değeri **
Vankomisin	%72 (18)	%65 (13)	0.614
Teikoplanin	%72 (18)	%65 (13)	0.614
Siprofloksasin	%12 (3)	%5 (1)	0.617
Tetrasiklin	%48 (12)	%75 (15)	0.066
Eravasiklin	%92 (23)	%100 (20)	0.495
Kinupristin-Dalfopristin	%52 (13)	%80 (16)	0.051
Gentamisin***	%44 (11)	%20 (4)	0.090
Streptomisin***	%20 (5)	%25 (5)	0.731
Linezolid	%100 (25)	%100 (20)	-

* Yüzdelere ilgili antimikrobiyal duyarlılık oranlarını göstermektedir.

*** p değerleri *E. faecium* izolatlarının biyofilm oluşturma durumlarına göre antibiyotik duyarlılık sonuçlarının kıyaslanması sonucu Pearson Ki-kare testi ile elde edilmiştir.

**** Aminoglikozitler için yüksek düzey direnç gözlenmeyen izolatların oranı verilmiştir.

5. TARTIŞMA

1980’li yıllara kadar Grup D streptokoklarla (Lancefield sınıflandırılması ile) birlikte sınıflandırılan enterokoklar, yapılan moleküler taksonomik çalışmalar sonucunda ayrı bir cins olarak sınıflandırılmıştır. Araştırmacıları taksonomik sınıflandırmalara iten nedenlerin başında enterokokların diğer tüm streptokoklardan daha dirençli bir antimikrobiyal patern çizmesi gelmiştir (117). İlerleyen artan farkındalığın da katkısıyla enterokokların dünya genelinde özellikle sağlık hizmeti ilişkili çoklu ilaca dirençli (ÇİD) patojenler olarak önemli rol oynadıkları anlaşılmıştır. Nitekim Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) *E. faecium*’u antibakteriyel ilaçlara dirençli ESKAPE patojenleri (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aereginosa* ve *Enterobacter* türleri) arasında göstermiştir (2). Yine DSÖ ilk kez 2017 yılında vankomisin dirençli *E. faecium*’u öncelikli bakteriyel patojenler listesinde yüksek öncelikli patojenler arasına dahil etmiş ve bunu 2024 listesinde de sürdürmüştür (2,52).

Enterokokların sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlardaki göreceli artışında pek çok faktör rol alsın da ortalama yaşam süresine paralel olarak artan komorbiditeli hasta oranı, yükselmiş kateterizasyon oranları ile artan sıklıkta uygulanan geniş spektrumlu profilaksi rejimleri (özellikle sefalosporinlerle olmak üzere) özellikle önemli görünmektedir (13,118). Enterokoklara bağlı gelişen insan enfeksiyonlarında baskın olarak saptanan 2 tür *E. faecalis* ve *E. faecium* olup özellikle son yıllarda *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* gibi enterokoklarla olan enfeksiyonların görülme sıklıklarında da artışlar görülmektedir (5). Epidemiyolojik eğilimde önemli bir nokta, birçok ülkede daha önceleri enfeksiyonlardan daha sık olarak izole edilen *E. faecalis* ile karşılaşma sıklığında sabit kalma veya azalma görülürken daha dirençli (özellikle glikopeptit) enfeksiyonlara yol açan *E. faecium* görülme sıklığında anlamlı bir artış gözlenmesidir (5, 8, 119).

Almanya’da kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan enterokok türleri arasında yapılan çok merkezli bir çalışmada *E. faecalis* izole edilen hastaların ortalama yaşı ile (71) *E. faecium* izole edilen hastaların ortalama yaşı (65) arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.0001$) bir fark tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *E. faecalis* izole edilen hastaların %69’u, *E. faecium* tespit edilen hastaların ise %65’i erkek olup bu fark da istatistiksel olarak ($p=0.008$) anlamlı bulunmuştur (119). Enterokoklardan kaynaklanan kan dolaşımı enfeksiyonlarını inceleyen 9 farklı çalışmadaki cinsiyet dağılımını değerlendiren bir derlemede erkek/kadın hasta oranı 1,4 olarak bulunurken incelenen 9 çalışmadan sadece

birinde kadınlar daha yüksek sıklıkta tespit edilmiştir (120). Çin’de 6 yıl boyunca kan kültüründen izole edilen Gram pozitif bakterilerin incelendiği bir çalışmada tüm isolatlar değerlendirildiğinde ortalama yaş 53 olarak tespit edilmişken enterokokların izole edildiği hastaların ortalama yaşı 59 olarak ($p<0.0001$) tespit edilmiştir (121). İspanya’da yapılan ve kan dolaşımı enfeksiyonlarından elde edilen *E. faecalis* isolatları ile *E. faecium* isolatlarını karşılaştıran çok merkezli bir çalışmada; *E. faecalis* elde edilen hastaların yaş ortalamaları (72) ile *E. faecium* elde edilen hastaların yaş ortalamaları (69) arasında istatistiksel olarak ($p=0.097$) fark bulunamamıştır. Yine bu çalışmada isolatların elde edildiği hastaların cinsiyetleri her iki tür içinde baskın olarak erkek iken, sırasıyla *E. faecalis* ve *E. faecium* için %68,8 ve %63,8 olmak üzere bu iki tür arasında bu konuda da istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır (122). Bizim çalışmamızda *E. faecalis* izole edilen hastaların %68,9’u erkek iken *E. faecium* izole edilen hastaların ise %46,7’si erkek olarak saptanmıştır ve iki türün izole edildiği hastaların cinsiyetleri arasındaki fark Almanya’da yapılan çalışmaya benzer biçimde istatistiksel olarak ($p=0.033$) anlamlı bulunmuştur. Enfeksiyonlardaki cinsiyet farkına yol açan olası faktörler arasında testosteron hormonunun nötrofil aktivasyonu sonucu inflamatuvar süreç ve doku hasarını artırıcı etki gösterebilmesi ve yine bu hormonun Majör Doku Uygunluk Kompleksi-2 (MHC-2) ve Toll Benzeri Reseptör-4 (TLR-4) ekspresyonunda azalma ile immünsüpresyon yapabilmesi suçlanmaktadır (123). Ortalama yaş açısından çalışmamızda -sırasıyla *E. faecalis* ve *E. faecium* için 56,4 ve 55,2 olmak üzere türler arasında bir fark bulunamamıştır (Bkz. Tablo 4.1). İtalya’da vankomisin dirençli enterokoklardan kaynaklanan kan dolaşımı enfeksiyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada artmış yaş (>60) bağımsız bir mortalite risk faktörü olarak tespit edilmiştir (89). Çalışmamıza dahil edilen isolatların ise %61,1 gibi yüksek bir kısmı bu bağımsız risk faktörüne sahiptir.

Hindistan’da enterokoklarla yapılan bir çalışmada izole edilen *E. faecalis* isolatlarının %43,2’si yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilmişken %29,7’si cerrahi branşlardaki hastalardan ve %27,1’i ise dahili branşlardaki hastalardan elde edilmiştir. Aynı çalışmada *E. faecium* için bu oranlar; %41,5 yoğun bakım, %34,1 cerrahi branşlar ve %14,4 dahili branşlar şeklindedir (124). Çalışmamızda branş dağılımı açısından dahili ve cerrahi klinikler olarak 2 grup oluşturulmuş olup *E. faecalis* isolatlarının %20’si cerrahi branşlardaki hastalardan %80’i dahili branşlardaki hastalardan elde edilmişken bu oran *E. faecium*’da cerrahi branşlar için %35,6 ve dahili branşlar için %65,4 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda türler arasında, izole edildikleri klinikler açısından istatistiksel fark

bulunmamış olmasına rağmen ($p=0.099$) *E. faecalis*'te *E. faecium*'a kıyasla daha yüksek olarak gözlenen dahili branş/cerrahi branş oranı (%80/%20'ye karşı %65,4/%36,6) Hindistan çalışmasıyla uyum göstermektedir. Çalışmamızda türler açısından en sık karşılaşılan branşlar *E. faecalis* için nefroloji (%22,2), onkoloji (%11,1) ve kardiyoloji (%11,1) iken *E. faecium* için onkoloji (%22,2), kardiyovasküler cerrahi (%13,3) ve genel cerrahi (%13,3) şeklindedir (Bkz. Tablo 4.2). Dikkat çekilmesi gereken bir nokta, nefroloji kliniklerinden elde edilen toplam 10 *E. faecalis* izolatının 9'unun ve 2 *E. faecium* izolatının 1'inin (%83,3'ü) erkek hastalardan izole edildiği ve nefroloji kliniklerinden izole edilen bu izolatların 10'unun (%83,3) orta veya güçlü nitelikte biyofilm oluşturduğudur. Literatürde yer alan diğer çalışmalar idrar yolu enfeksiyonları ve buna bağlı gelişen ürosepsis vakalarında özellikle ileri yaşlı erkek hastalarda *E. faecalis*'in önemine vurgu yapmaktadır. Bu enfeksiyonlarda özellikle kateterizasyon varlığında biyofilm oluşumu da önem arz etmektedir (53, 125, 126). Nitekim bahsi geçen 12 kökenin izole edildiği hastaların 10'u 60 yaş ve üzerinde olup bu 12 hastanın yaş ortalaması ise 70'tir. Yine enfektif endokardit klinikli hasta grubunu içermeye ihtimali, diğer branşlardaki hastalardan elde edilen izolatlara göre görece çok olan kardiyovasküler cerrahi ve kardiyoloji hastalarından elde edilen izolatlar değerlendirildiğinde izolatların %52,9'unu *E. faecalis* ve %47,1'ini *E. faecium* oluşturmaktadır. Bu iki bölümden dahil edilen hastaların %47'si erkek hastalardan oluşurken yaş ortalaması ise 57,7 olarak bulunmuştur. Bu veri, enterokoklara bağlı enfektif endokardit olgularına, yaşlı hasta grubunda daha sık karşılaşıldığını belirten literatürle uyumsuz gibi görülse de verilerimiz detaylı incelendiğinde kardiyovasküler cerrahi hastalarından 4'ünün (%23,5) yeni doğan hasta grubuna ait olduğu ve bunlar dahil edilmediğinde kalan 13 hastanın yaş ortalamasının literatürle uyumlu biçimde 75,3 olduğu görülmüştür (35, 36). Enfektif endokardit kliniğinde biyofilm formasyonunun önemli olabileceğini doğrular biçimde bu hasta grubundan elde edilen izolatların %76,5'inde biyofilm formasyonu oluşumu (%41,1'inde orta veya güçlü yapıda olacak şekilde) görülmüştür.

Kan kültürü pozitifleşme süresi birçok durumda bakteri yükünü tahmin etmede faydalı olabildiği gibi kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu şüphesinde ise tanıda faydalı yardımcı bir kriter olarak görülmektedir. Bu klinik tablodan şüphelenildiğinde kateterden alınan kan kültürünün eş zamanlı alınan periferik kan kültüründen 2 saat önce pozitifleşmesi ve her iki örnekte aynı mikroorganizmanın üremesi tanıda oldukça yardımcıdır (127). Literatür incelendiğinde *S. aureus* için kan kültürü pozitifleşme süreleri bakteriyeminin kaynağı endokardit odağı olduğunda diğer bakteriyemi kaynaklarına oranla çok daha kısa

olarak gözlenmişken benzer bir durum *E. faecalis* için de tespit edilmiştir. Fakat bu fark *S. aureus* için olanın aksine *E. faecalis* için istatistiksel olarak anlamlı değildir (128). Almanya’da enterokoklarla yapılan bir çalışmada kan kültürü pozitifleşme süreleri *E. faecalis* için ortalama 9,2 saat ve *E. faecium* için ise 12,1 saat olarak bulunmuştur. Bu çalışmada daha kısa pozitifleşme sürelerinin bağımsız bir öngörü faktörü olmamakla birlikte daha yüksek morbidite ve mortalite eğilimine yol açtığı da tespit edilmiştir (129). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmanın aksine *E. faecalis* izolatlarında *E. faecium* izolatlarına göre daha uzun pozitifleşme süreleri (sırasıyla 31,6 ve 29,6 saat) tespit edilmiş olmakla birlikte (Bkz. Tablo 4.3) bu fark istatistiksel olarak ($p=0.701$) anlamlı bulunmamıştır.

SENTRY antimikrobiyal sürveyans programları gibi dünya çapında kan dolaşımı enfeksiyonları eğilimlerini değerlendiren programların da işaret ettiği üzere çeşitli coğrafi bölgeler arasında antimikrobiyal direnç açısından ciddi farklılıklar gözlenebilmektedir. Nitekim vankomisin dirençli enterokok enfeksiyonlarıyla (özellikle *E. faecium*’da) Kuzey Amerika ve Latin Amerika’da; Avrupa ve Asya-Pasifik bölgesine oranla çok daha yüksek sıklıkta karşılaşılmaması buna güzel bir örnektir (130). Bu farklılıklar kıta veya ülke seviyesinden çok daha küçük ölçekte, aynı ülkenin farklı merkezleri arasında da ciddi seviyelerde olabilmektedir. Örneğin Almanya’da kan kültüründen izole edilen enterokoklarla yapılan bir çalışmada Güney Almanya bölgesinde 2015-2019 yılları arasında VRE oranlarında ciddi bir yükseklik gözlenirken bu durum Kuzey Almanya bölgesinden elde edilen izolatlarda gözlenmemiştir (131). Bu farklılıklara yol açan pek çok faktör olmakla birlikte; tedavi veya profilakside yaygın kullanılan rejimlerin farklılıkları, enfeksiyon kontrol uygulamalarındaki farklılıklar, tarım ve hayvancılıkta antibiyotik kullanımı (avoparsin gibi) farklılıkları ve daha dirençli enfeksiyonlara yol açan klonların bölgesel dağılım farklılıkları başı çeken faktörler olarak görünmektedir (89, 130, 131).

Antalya’da 2023 yılında kan kültüründen elde edilen 623 enterokokla yapılan bir çalışmada *E. faecalis* izolatlarının hiçbirisinde vankomisin ve teikoplanin direnci gözlenmezken *E. faecium* izolatlarında bu oranlar sırasıyla %12,8 ve %10,7 olarak gözlenmiştir. Aynı çalışmada YDGD oranları ise sırasıyla *E. faecalis* ve *E. faecium* için %23,6 ve %50,5 olarak bulunmuştur (132). Türkiye’de 2000-2015 yılları arasında yapılan bir meta-analiz çalışmasının verilerine göre ise *E. faecalis* izolatlarında YDGD oranı %37,1 ve YDSD oranı ise %43,2 iken *E. faecium* izolatlarında bu oranlar sırasıyla ortalama %58,7 ve %74,4’tür. Vankomisin direnç oranları ise bu derlemede *E. faecalis* ve *E. faecium* için sırasıyla %2,2 ve %10,3 olarak bulunmuştur (79). İstanbul’da 2022 yılında kan kültüründen elde edilen

enterokoklarla yapılan bir çalışmada ise *E. faecalis* izolatlarının %1,5'inde vankomisin ve %3,6'sında teikoplanin direnci tespit edilirken bu oranlar *E. faecium* izolatları için sırasıyla %32,1 ve %31,2 şeklindedir (133). Bu çalışmada YDGD oranları *E. faecalis* ve *E. faecium* için sırasıyla %39,4 ve %74,3 iken YDSD için ise sırasıyla %40,9 ve %71,6 şeklindedir. Bizim çalışmamızda ise diğer birçok çalışmada olduğu gibi *E. faecalis* izolatlarında vankomisin ve teikoplanin direnciyle karşılaşılmazken *E. faecium* izolatlarında ise bu oran her iki antimikrobiyal için %31,1 olarak gözlenmiştir. Bu direnç oranı Antalya'da yapılan çalışmadan ve bahsedilen derlemedeki oranlardan çok daha yüksekken İstanbul'da yapılan çalışmayla benzerdir. Çalışmamızda *E. faecalis* ve *E. faecium* için YDGD oranı sırasıyla %24,4 ve %66,7 iken YDSD oranları ise %26,7 ve %77,8 olarak gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.4). Derleme ile kıyaslandığında çalışmamızın *E. faecium* izolatlarında daha yüksek YDGD ve YDSD oranları gözlenirken bu durum *E. faecalis* izolatları açısından tam tersi olarak gözlenmiştir (79).

Merkez-1 ve Merkez-2'de *E. faecalis* izolatlarının %13,3'ü hem YDGD hem de YDSD gösterirken bu oran Merkez-3'ten izole edilen *E. faecalis* izolatlarında %20 olarak gözlenmiştir. Merkez-1'de *E. faecium* izolatlarının %20'si hem YDGD hem de YDSD gösterirken bu oran Merkez-2 *E. faecium* izolatlarında %40 ve Merkez-3 *E. faecium* izolatlarında ise %86,7 olarak gözlenmiştir. Bu durum aminoglikozitlerin duyarlılıklarının test edilirken, gentamisin ve streptomisin antibiyotiklerinin her ikisi açısından da test edilmesinin gerekliliğini göstermektedir. Yine bu veriler YDGD ve YDSD direncine neden olan farklı direnç mekanizmalarının (farklı AME'ler gibi) varlığına da işaret etmektedir.

Çalışmamızın güçlü yanı 3 merkezin dahil edilmesi ve bu sayede elde edilen direnç oranları ile biyofilm formasyonu farklılıklarının karşılaştırılmasına imkan tanınmasıdır. Nitekim *E. faecalis* izolatları arasında merkez bazlı önemli farklılıklar olmasa da *E. faecium* izolatlarında aminoglikozitlere karşı gösterilen direncin düzeyi açısından önemli farklılıklar vardır. Merkez-1'den elde edilen *E. faecium* izolatlarının %66,7'sinde YDGD saptanmazken bu oranlar Merkez-2 ve Merkez-3'te sırasıyla %20 ve %13,3 olup aradaki fark istatistiksel olarak (Merkez 1-Merkez 2 arasındaki için $p=0.030$ ve Merkez 1-Merkez 3 arasındaki için $p=0.009$) anlamlıdır. Yine Merkez-1'den elde edilen *E. faecium* izolatlarının %40'ında YDSD gözlenmezken bu oranlar Merkez-2 ve Merkez-3'te sırasıyla %26,7 ve %0 olup Merkez-1 ile Merkez-3 arasındaki fark istatistiksel olarak ($p=0.021$) anlamlıdır. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte glikopeptit duyarlılık oranları arasında da merkez bazlı önemli farklılıklar vardır. Merkez-3'te vankomisin ve teikoplanin duyarlılık oranları

E. faecium için %53,3 iken bu oranlar Merkez-1 ve Merkez-2’de sırasıyla %86,7 ve %66,7 şeklindedir. Daha önceden de verilerine başvurulmuş bir derlemede (79) ülkemizde *E. faecium* izolatlarında en yüksek vankomisin direnç oranı Akdeniz bölgesinde (%30,9) görülürken, İç Anadolu bölgesi ise 3. en yüksek (%24,1) direnç gözlenen bölge olmuştur. Bizim çalışmamızda ise hem en yüksek hem de en düşük vankomisin direnci gözlenen merkezler İç Anadolu bölgesinden [sırasıyla Merkez-3 (%47,7) ve Merkez-1 (%13,3)] tespit edilmiştir. Test edilen diğer tüm antibiyotiklerde duyarlılık oranları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Bkz Tablo 4.5 ve 4.6). Bu farklılıklar sürveyans çalışmalarının sadece ülke veya coğrafi bölge verileri baz alınarak değil merkez bazlı olarak da yürütülmesi gerektiğini ve bu çalışmaların düzenli yapılmasının önemini göstermektedir. Nitekim enfektif endokardit, sepsis ve komplike üriner sistem enfeksiyonu gibi morbidite ve mortalite oranları yüksek tablolarda bu çalışma verilerinin özellikle ampirik tedavi tercihlerinde yol gösterici olabileceği düşünülmekte olup merkez bazlı farklılıklar dikkat çekicidir.

Yetmiş dört çalışmanın incelendiği global bir derlemede ülkemizin de dahil olduğu DSÖ Avrupa bölgesinde *E. faecalis* izolatlarında vankomisin direnç oranı %3, teikoplanin direnç oranı %4,6, YDGD oranı %34,9, YDSD oranı %46,4, siprofloksasin direnç oranı %43,1 ve tetrasiklin direnç oranı %64,4 olarak gözlenirken ampisilin, imipenem ve linezolid direnç oranları (sırasıyla %9,8, %2,6 ve %1) ise oldukça düşük gözlenmiştir (134). Elli dört çalışmanın irdelendiği bir derlemede ülkemizin de dahil olduğu DSÖ Avrupa bölgesinde *E. faecium* izolatlarında vankomisin direnç oranı %9,3, teikoplanin direnç oranı %14,4, YDGD oranı %49,5, YDSD oranı %52,5, siprofloksasin direnç oranı %60,8, tetrasiklin direnç oranı %13,3 ve linezolid direnç oranı %1,2 olarak gözlenmişken izolatların büyük kısmı ampisilin ve imipeneme (sırasıyla %64,6 ve %70,4) karşı dirençli olarak bulunmuştur (135). Çalışmamızda da bu iki global derlemenin sonuçlarına benzer biçimde *E. faecalis* izolatlarında çoğu antibiyotiğe karşı duyarlılık oranlarının *E. faecium* izolatlarına kıyasla yüksek olduğu, *E. faecium* izolatlarında ise tetrasiklin duyarlılık oranlarının *E. faecalis* izolatlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek olduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.4). Çalışmamızın *E. faecium* izolatlarındaki glikopeptit direnci (%31,1’e karşın %9,3), YDGD (%66,7’ye karşın %49,5) ve YDSD (%77,8’e karşın %52,5) direnç oranlarının yukarıda bahsi geçen global derlemede DSÖ Avrupa bölgesi için tespit edilen orana kıyasla oldukça yüksek oluşu dikkat çekicidir (135). Bu durumdan; ülkemiz enfeksiyonlarından başlıca sorumlu olan klonların dirençli klonlar olması, dirençten sorumlu olan genlerin yüksek prevalansta bulunuşu ve hızlı horizontal yayılımı, yetersiz enfeksiyon

kontrol önlemleri sonucu yaygın nozokomiyal yayılım, bahsi geçen antibiyotiklerin geniş ölçekte klinik kullanımı ve hayvancılıkta yaygın antibiyotik kullanımı gibi nedenler sorumlu olabilir. Bu görece düşük DSÖ Avrupa bölgesi direnç oranlarına neden olabilecek bir başka neden ise bu verilerin toplanmasına en büyük katkıyı veren ülkelerin İtalya ve Almanya gibi görece düşük direnç oranlarına sahip ülkeler olmasıdır (135). Fakat daha önceden de değinildiği gibi çalışmamızda ülkemiz literatüründe belirtilen direnç verilerine kıyasla da daha yüksek direnç oranlarına (özellikle glikopeptit direnci, YDGD ve YDSD açısından) rastlanıldığı unutulmamalıdır. Çalışmamızda hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* izolatlarına karşı en yüksek etkinlik gösteren antibiyotik linezolid (%100) olarak tespit edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarında en düşük duyarlılık gözlenen antibiyotik tetrasiklin iken (%28,9) *E. faecium* izolatlarında ise -intrensek ampisilin ve imipenem direnci dışlanacak olursa- en az duyarlılık gözlenen antibiyotik (%8,9) siprofloksasin olarak değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.4).

Önemli bir nokta, yapılan literatür araştırmalarında görüldüğü kadarıyla ülkemizde eravasiklin dirençli enterokok izolatlarının ilk kez tespit edilmiş olmasıdır. Biz çalışmamızda 2 adet *E. faecium* izolatında eravasiklin direnci tespit ettik. Eravasiklin yeni geliştirilmiş bir tetrasiklin türevi olup florosiklin antibiyotik grubunun bir üyesidir. VRE' ler de dahil olmak üzere eravasiklin direnci enterokoklarda nadirdir. Nitekim bizim çalışmamızda tüm izolatlar açısından bakıldığında eravasiklin duyarlılığı %97,8 iken glikopeptit direnci gösteren izolatlarda eravasiklin duyarlılık oranı ise %92,9'dur. Dirençte 30S ribozomal alt birimin S10 ribozomal proteinini kodlayan *rpsJ* genindeki çeşitli mutasyonların, EmeA gibi eflüks pompaları aracılı dışa atımın ve ribozomal korunma proteinlerini kodlayan *tetM* ve *tetL* gibi genlerdeki mutasyonların önemli rol oynadığı literatür çalışmalarında bildirilmiştir (74, 136). 2013-2017 arasında izole edilen gram pozitif bakterilere karşı eravasiklin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada test edilen 1586 *E. faecalis* izolatının %99,4'ü eravasikline karşı duyarlı olarak tespit edilmişken test edilen 1221 *E. faecium* izolatının ise %97,7'si eravasikline karşı duyarlı olarak bulunmuştur (136). Bizim çalışmamızda ise *E. faecalis* izolatlarının %100'ü eravasikline karşı duyarlı iken *E. faecium* izolatlarının %95,5'i duyarlı bulunmuştur. Eravasiklin direnci gösteren izolatlardan birisi tetrasiklin (literatürde nadir), glikopeptitler ve linezolid hariç tüm antibiyotiklere dirençliyken diğer izolatta ise linezolid hariç test edilen tüm antibiyotiklere direnç gözlenmiştir. Çalışmamızda CLSI'a göre tetrasiklin direnci veya orta duyarlılığı gösteren izolatların %98,1'inde EUCAST'e göre eravasiklin duyarlılığı tespit edilmişken;

CLSI'a göre tetrasiklin duyarlılığı gösteren izolatların sadece %2,6'sında EUCAST'e göre eravasiklin direnci gözlenmiştir.

Eravasiklin -tigesikline benzer biçimde- tetrasiklin direncine yol açan *tet(L)* gibi genlerin kodladığı eflüks pompaları ve *tet(O)* gibi ribozomal korunma proteinleri aracılı direnç mekanizmalarının varlığında yüksek düzeyde etkinlik gösterebilmektedir. Literatürde hem tigesiklin hem de eravasiklin direncine neden olabilen önemli bir mekanizma 30S ribozomal alt birimin S10 ribozomal proteinini kodlayan *rpsJ* genindeki (Y58D gibi) mutasyonlar olarak belirtilmiştir (137, 138). Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmada eravasiklin direnci gözlenen 35 enterokokun sadece 2'sinde (%5,7) tetrasiklin duyarlılığı gözlenmiştir. Bu oran bizim çalışmamızda ise %2,6'dır. Yine bu çalışmada eravasiklin dirençli enterokoklara karşı en yüksek in vitro etkinlik sırasıyla linezolid, vankomisin ve tigesiklinde gözlenmiştir (139). Bir çalışmada tigesikline dirençli bir *E. faecium* izolatında tetrasiklin direnci gözlenmemiş ve bu izolatın *tet(L)* ve *tet(M)* gibi tetrasiklin direncine neden olan genleri barındırmadığı; fakat *rpsJ* geninde çoklu mutasyonlar içerdiği gözlenmiştir (137). Eravasiklin direncinde de bu genin mutasyonlarının önemi düşünüldüğünde çalışmamızdaki eravasiklin dirençli, tetrasiklin duyarlı izolatta da *rpsJ* geninde mutasyon varlığı ve tetrasiklin direncine yol açan diğer genlerin (*tet(L)* ve *tet(M)* gibi) mevcut olmaması ihtimali akla gelmektedir. "Tetrasiklin duyarlı-eravasiklin dirençli" şeklinde paradoks olarak değerlendirilebilecek bir antibiyotik duyarlılık profiliyle karşılaşılmamasında; farklı rehberler (eravasiklin için EUCAST, tetrasiklin için CLSI) kullanılmasının ve farklı sınır değerlerin valığının da payı olabileceği düşünülmektedir (Bkz. Tablo 3.1 ve 3.2).

Hindistan'da çeşitli klinik örneklerden elde edilen enterokoklarla yapılan bir çalışmada; vankomisine dirençli enterokokların %93,3'ünde YDGD gözlenirken, vankomisine duyarlı enterokokların ise sadece %31,2'sinde YDGD gözlenmiştir. Bu oranlar -sırasıyla vankomisine dirençli ve duyarlı grup için- YDSD açısından %80'e %27,7; teikoplanin açısından %86,7'ye %0 ve siprofloksasin açısından %93,3'e %78,1 olarak izlenmiştir. Linezolide ise her iki grupta da direnç gözlenmemiştir (140). EARS-Net veri tabanı kullanılarak 27 Avrupa ülkesi verisinin irdelendiği bir çalışmada vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarında gentamisin direnç oranı %48,5 olarak gözlenirken vankomisine duyarlı *E. faecium* grubunda ise bu oran %43,4 olarak gözlenmiştir. Teikoplanin direnç oranı ise ilk grupta %80,4 ikinci grupta ise %0,4 olarak belirlenmiştir (141). Türkiye'de klinik enterokok izolatlarıyla yapılan bir çalışmada vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarının %63,6'sında YDGD ve %72,7'sinde YDSD gözlenirken bu oranlar vankomisine duyarlı

E. faecium izolatlarında -sırasıyla YDGD ve YDSD açısından- %29,4 ve %38,2 olarak gözlenmiştir. Bu çalışmada aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (142).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak; vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarında, vankomisine duyarlı *E. faecium* izolatlarına kıyasla yüksek düzey gentamisin, teikoplanin, yüksek düzey streptomisin, siprofloksasin ve eravasiklin direnci açısından daha yüksek direnç oranları gözlenmiştir. Buna zıt olarak streptogramin ve tetrasiklin direnç oranları ise vankomisine duyarlı grupta daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu direnç oranı farklılıklarından sadece teikoplanin ve yüksek düzey gentamisin açısından olan istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İstatistiki anlamlı olan bu korelasyondan yapısında aynı anda hem Tn5281 transpozonunu (*aac(6')*-*Ie-aph(2'')*-*Ia* genini barındıran) hem de Tn1546 transpozonunu (*vanA* genini barındıran) barındırabilen pMG1 gibi bir plazmidin sorumlu olması olasıdır (143). Bunun gibi aynı anda hem glikopeptit hem de yüksek düzey gentamisin direncine neden olan genleri taşıyan plazmidler; hem glikopeptit-yüksek düzey gentamisin sinerjisini engellemeleri, hem de bu kombine direnci horizontal olarak hızlı biçimde yayabilmeleri açısından ayrıca önemlidirler. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte vankomisine dirençli *E. faecium* ile vankomisine duyarlı *E. faecium* arasında YDSD açısından da önemli direnç farklılıkları bulunmuştur. Çin’de yapılan bir çalışmada bir idrar izolatında *rep2* tipi bir plazmidde (pVRE1-VanA) aynı anda *vanA*, *ant(6')*-*Ia* ve *aph(3')*-*IIIa* direnç genlerine rastlanılmıştır (144). Aynı anda hem YDSD genlerini hemde glikopeptit direnç genlerini barındırabilen bu gibi plazmitlerin mevcudiyeti vankomisine dirençli grupta vankomisine duyarlı gruba oranla daha yüksek sıklıkta görülen YDSD için olası bir mekanizmadır. Yine hem glikopeptit-yüksek düzey streptomisin sinerjisini engellemeleri, hem de bu kombine direnci horizontal olarak hızlı biçimde yayabilmeleri açısından bu gibi plazmitler özellikle önemlidirler.

Gözlemsel klinik verilerle desteklendiği üzere in vitro beta-laktam/glikopeptit-aminoglikozit bakterisidal sinerjisinin tespiti enfektif endokardit hastalarında artmış kür oranlarını sağlamaktadır (145). Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozit direnci saptanmaması durumunda, izolat penisilinlere de duyarlıysa aminoglikozitlerle penisilinler arasında sinerji beklenmektedir. Benzer şekilde, yüksek düzey aminoglikozit direnci saptanmaması durumunda, izolat glikopeptitlere de duyarlıysa aminoglikozitlerle glikopeptitler arasında sinerji beklenmektedir. Bizim çalışmamızda *E. faecalis* izolatlarının hepsi ampisilin ve glikopeptitlere karşı duyarlı olduğu için in vitro sinerji oranları direkt olarak YDGD ve YDSD oranları ile ilişkili olarak bulunmuştur. Merkez-1’de *E. faecalis* için

en yüksek sinerji oranı ampisilin/glikopeptit ile streptomisin sinerjisinde (%80) gözlenirken, Merkez-2 ve Merkez-3'te ise en yüksek sinerji oranı ampisilin/glikopeptit ile gentamisin arasında (sırasıyla %86,7 ve %73,3) gözlenmiştir. *E. faecium* izolatlarında ise ampisiline intrinsek direnç olmasından ötürü beta-laktam-aminoglikozit sinerjisi beklenmezken Merkez-1'de glikopeptit-gentamisin sinerji oranı %66,6 ve glikopeptit-streptomisin sinerji oranı %40 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar Merkez-2 için sırasıyla %13,3 ve %20 iken, Merkez-3'te ise %13,3 ve %0'dır (Bkz. Tablo 4.8). *E. faecium*'daki bu belirgin fark Merkez-1'de özellikle glikopeptit/gentamisin kombinasyonunun önemli bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilirliğinin sürdüğünü; fakat Merkez 2 ve 3'te önemli kısıtlamalar olduğunu göstermektedir. Beta-laktam/glikopeptit-Yüksek düzey aminoglikozit kombinasyonu tüm merkezlerde bazı farklılıklar içermekle birlikte *E. faecalis* için önemli tedavi rejimleri adayları olarak varlıklarını sürdürmektedir.

İran'da 2002 ile 2015 arasında yapılan 15 çalışmayı gram pozitif bakterilerdeki YDGD'ye neden olan AME'ler açısından değerlendiren bir derlemede *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* ve *aph(3'')-IIIa* en sık rastlanan genler olmuşken, özellikle (%97,7 oranında) *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ile karşılaşmıştır. Bu genin amikasin, gentamisin, kanamisin gibi potent aminoglikozitlerin hepsine karşı yüksek düzey dirence neden olması, yüksek prevalansı ve mobil genetik elemanlarla rahatlıkla aktarılabilmesi açısından ayrıca bir öneme sahip olduğu vurgulanmıştır (146). Yine birçok çalışmada bu genlerin varlığının gösterilmesinin fenotipik dirençle çok yüksek oranda uyumlu olduğu ve dağılımları ile mevcudiyetlerinde farklılıklar olmakla birlikte YDGD açısından en sık karşılaşılan genin *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* olduğu vurgulanmıştır (81, 82, 146). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak YDGD gösteren izolatların %92,7'sinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* geni tespit edilmişken *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* geni pozitifliğine hiçbir izolatta rastlanılmamıştır. Fenotipik direnç gözlenip direnç geni mevcudiyeti belirlenememiş üç izolatta ise; 16S rRNA metiltransferaz enzimi aracılı 16S rRNA'nın metilasyonu, ribozomal koruma proteinleri veya 16S rRNA'da mutasyonlar sonucu hedef modifikasyonu, proton itici gücünün oluşturulmasındaki bozulmalar sonucu ilacın azalmış importu ve EmeA gibi eflüks pompaları aracılı artmış ilaç atımı gibi farklı direnç yollarından bir veya daha fazlasının mevcut olduğu düşünülmüştür (147, 148, 149).

Streptomisin, YDGD'ye en sık yol açan *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* varlığında beta- laktam/glikopeptit ajanlarla sinerjisini sürdürebilmesi açısından önemlidir. Çeşitli çalışmalarda bu dirence en sık yol açan genler arasında *aph(3'')*, *ant(3'')-Ia* ve *ant(6')-Ia*

gibi genlerin mevcudiyeti gösterilmiş olsa da birçok çalışmada dirençten en sık sorumlu tutulan gen *ant(6')-Ia* olmuştur (78, 83, 150, 151). Nitekim Japonya'daki bir çalışmada YDSD gösteren enterokokların %97,6'sında bu gene rastlanırken Amerika'da ki bir çalışmada ise %99,6 oranında *ant(6')-Ia* genine rastlanmıştır (150, 151). Bizim çalışmamızda ise literatürle uyumlu olarak fenotipik olarak YDSD gösteren izolatların %95,7'sinde *ant(6')-Ia* geni tespit edilmişken izolatların hiçbirisinde *ant(3'')-Ia* genine rastlanılmamıştır. 2 izolatta ise direnç için taranılan hiçbir gende pozitiflik gözlenmemiştir. Fenotipik direnç gözlenip direnç geni mevcudiyeti belirlenememiş 2 izolatta ise *aph(3'')* gibi başka bir direnç geni mevcudiyeti yada YDGD'de bahsedilen diğer nadir direnç mekanizmalarından bir veya birden çoğunun sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

Yirmi yedi ülkeden 49 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada glikopeptit direnci gösteren izolatların %78,2'sinde *vanA* geni tespit edilmiştir (152). Türkiye'de 7 bölgeden 8 laboratuvarın katıldığı bir çalışmada vankomisin dirençli *E. faecium* izolatlarının hepsinde *vanA* geni tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, elde edilen vankomisin dirençli izolatların %78,8'inin klonal olarak ilişkili olduğu ve farklı coğrafi bölgeler arasında klonal yayılımın özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarla güçlü bir ilişki gösterdiği belirtilmiştir (153). Bizim çalışmamızda da literatürle benzer biçimde glikopeptit direnci gözlenen izolatların tümünde *vanA* geni saptanırken hiçbir izolatta *vanB* genine rastlanmamıştır.

Enterokok türlerinin neden olduğu (özellikle enfektif endokardit, kateter ilişkili kan dolaşımı ve üriner sistem enfeksiyonları gibi) pek çok enfeksiyonda biyofilm oluşumunun önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (97, 98, 99). Çin'de 7 yıl boyunca kan kültüründen elde edilen izolatlarla yapılan bir çalışmada *E. faecalis* izolatlarının %91,7'sinde biyofilm oluşumu gözlenirken, *E. faecium* izolatlarının sadece %20'sinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışmada biyofilm oluşturan *E. faecalis* izolatlarının %27,8'i güçlü, %43,1'i orta ve %20,8'i zayıf güçte biyofilm oluştururken *E. faecium* izolatlarının oluşturduğu biyofilmlerin ise %95,5'i zayıf ve sadece %4,5'i güçlü yapıda olarak gözlenmiştir (154). Afrika hariç 6 farklı kıtada yapılan 56 çalışmayı irdeleyen verilerle yapılan bir meta analiz çalışmasında *E. faecalis* izolatlarının %68,7'si biyofilm oluşturmuşken (oluşturanların %47,9'u güçlü ve %38,1'i orta güçte) kıtalar ve bölgeler (DSÖ) arasında biyofilm oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. En yüksek prevalans DSÖ Amerika bölgesinde (%89,8) gözlenirken en düşük prevalans ise Güney-Doğu Asya bölgesinde (%57,9) gözlenmiştir. Ülkemizin de dahil olduğu Avrupa bölgesindeki havuzlanmış prevalans ise %64,21'dir. Yine bu çalışmada aradaki farklılıkta

enfeksiyona yol açan farklı klonların farklı biyofilm yapma yeteneklerinin payı olabileceği özellikle vurgulanmıştır (155). Bizim çalışmamızda ilişkili literatürün çoğuyla benzer biçimde; ama çoğu çalışmaya göre daha yüksek oranlarda biyofilm oluşumu gözlenmiştir (154, 155, 156). *E. faecalis* izolatlarının tamamı biyofilm oluşturmuşken *E. faecium* izolatlarının ise %55,6'sında biyofilm oluşumu gözlenmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bulunmuştur. Biyofilm formasyonları kantitatif değerlendirildiğinde ise *E. faecalis* izolatlarının %35,6'sı güçlü, %40'ı orta güçte ve %24,4'ü zayıf güçte biyofilm oluştururken *E. faecium* izolatlarının ise %51,1'i zayıf ve sadece %4,5'i ise orta güçte biyofilm oluşturmuştur. Elde edilen kantitatif sonuçlar da literatüre benzer biçimde *E. faecalis* izolatlarının *E. faecium* izolatlarına göre daha güçlü yapıda biyofilm oluşturmaları açısından benzeşmektedir (154, 155, 156). Bu duruma yol açabilecek pek çok faktör olmakla birlikte; biyofilm oluşumunda önemli işlevleri olduğu düşünülen Agg, GelE, Esp ve Ebp gibi virülans faktörlerinin *E. faecalis* izolatlarında *E. faecium* izolatlarına oranla daha sık görünmesi ve *E. faecalis*'in HDPM oluşturma açısından daha verimli metabolik yollar kullanması en önemli faktörler olarak görülmektedir (4, 156, 157). Nitekim Türkiye'de kan kültüründen elde edilen enterokoklarla yapılan bir çalışmada *E. faecium* elde edilen hastalarda *E. faecalis* elde edilenlere oranla santral venöz kateterizasyon, mekanik ventilasyon ve idrar sondası takılması gibi (yabancı cisim aracılı biyofilm formasyonu oluşumuna yatkınlık yaratan) invaziv girişimler daha sık yapılmış olarak gözlenmiştir. Bu görece daha az sıklıkta yabancı cisim maruziyetine rağmen endokardit ve kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarından (biyofilm oluşumu ile güçlü ilişkisi olan enfeksiyonlar) *E. faecalis* izolatlarının daha sık izole edilmiş olması in vitro olarak tespit edilen bu durumun klinik bir yansıması olarak düşünülebilecek önemli bir bulgudur (157).

Çalışmamızda merkezler arası biyofilm oluşumu farklılıkları da değerlendirilmiştir. Merkez-1'deki *E. faecalis* izolatlarının %73,4'ü güçlü yapıda biyofilm oluştururken Merkez-2 ve 3'te bu oranlar sırasıyla %13,3 ($p=0.003$) ve %20 ($p=0.010$) olarak bulunmuş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edilmiştir. Aradaki farka neden olabilecek; daha yaygın kateterizasyon uygulanması, bakteriyeminin kaynağı (örneğin prostetik kapak ilişkili enfektif endokarditte daha yüksek) ve enfeksiyona yol açan klonlardaki farklılıklar gibi birçok durum söz konusu olabilir (156). Olası bir diğer neden ise hasta profilidir. Merkez 1'deki *E. faecalis* izolatlarının elde edildiği hastaların %40'lık bir kısmı nefroloji ve %40'lık diğer bir kısmı ise onkoloji ve kardiyovasküler cerrahi

tarafından takip edilen yaşı (belirtilen hastaların yaş ortalaması 56,8) hastalardır. Bu hastaların olası ürosepsis ve enfektif endokardit gibi kliniklere sahip olma ile eşlik eden kateterizasyon-invaziv girişim oranlarının yüksek olma ihtimali de göz önünde bulundurulmalıdır.

Biyofilm formasyonu antimikrobiyal penetrasyonda azalma, formasyon içindeki mikroorganizmaların azalmış metabolizması ve değişmiş mikro çevre ile formasyon içindeki mikroorganizmaların yakınlaşması nedeniyle bakteriyel gen aktarımlarında artış gibi pek çok nedenle antimikrobiyal dirençte önemli rol oynar (100). Çin’de idrar yolu enfeksiyonuna yol açan enterokoklarla yapılan bir çalışmada biyofilm ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelendiğinde siprofloksasin, tetrasiklin ve YDGD olan izolatların bu direnci içermeyenlere göre daha güçlü yapıda biyofilm oluşturduğu gözlenmiş fakat aradaki fark anlamlı bulunmamıştır (156). İran’da yapılan çok merkezli bir çalışmada ise test edilen birçok antibiyotik arasında tetrasiklin, YDGD, YDSD, kinupristin/dalfopristin ve kloramfenikol direnci içeren enterokoklarda içermeyenlere oranla güçlü biyofilm oluşumu daha yüksek sıklıkta gözlenmiştir. Aradaki farklılık YDGD ve tetrasiklin için olan hariç olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (158). Bizim çalışmamızda ise güçlü biyofilm oluşturan *E. faecalis* izolatlarında siprofloksasin, YDG ve YDS direnç oranları orta ve zayıf güçte oluşturanlara oranla daha yüksek olarak tespit edilmiş, güçlü biyofilm oluşturanlardaki YDGD oranı ile orta güçte biyofilm oluşturanlardaki YDGD oranı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.023$). Çalışmamızda *E. faecium* açısından yapılan değerlendirmede ise siprofloksasin, kinupristin-dalfopristin ve YDG direnç oranları orta güçte biyofilm oluşturan izolatlarda zayıf veya hiç oluşturmayanlara kıyasla daha yüksek görülmüş fakat aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *E. faecium* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamakla birlikte kinupristin-dalfopristin duyarlılıkları (biyofilm oluşturanlarda %52, oluşturmayanlarda %80) arasındaki fark istatistiksel anlamlılık sınırına çok yakın bulunmuştur ($p=0.051$). Fakat bu sonuçların biyofilm formasyonunun in vivo antimikrobiyal etkinliği üzerine olan etkilerini tam olarak yansıtmayacağı (ilaç penetrasyonunu azaltması vb nedenlerle) unutulmamalıdır.

Enterokoklarda (özellikle *E. faecalis*’te) feromon aracılı konjugasyon olarak bilinen özel bir konjugatif süreç gözlenmektedir. Bu süreçte gen aktarımı bir pilus aracılığıyla değil alıcı hücrelerin (gen) verici hücrelere salgıladığı feromon adı verilen kısa peptitler aracılığıyla gözlenen ve agregasyon faktörü (agg) gibi virülans faktörleri ile biyofilm formasyonu

oluşumu gibi özelliklerin yardımcı olduğu hücrel yakınlaşma aracılığı ile gerçekleşmektedir (159). Feromon aracılı konjugasyonla gen aktarımı yapan birçok plazmidin antibiyotik direnci, konak savunma sistemine adaptasyon, Ultraviyole (UV) direnci ve bakteriyolizin-sitolizin üretimi gibi pek çok virülans faktörü kazanımıyla ilgili olabileceği anlaşılmıştır (24, 25, 159). Örneğin pCF10 *tet(M)* aracılı tetrasiklin ve pMG2200 *vanB* aracılı vankomisin direncine neden olabilen plazmitlerdendir (160, 161). Tokyo’da yapılan bir çalışmada sağlık hizmeti ilişkili YDGD’li enterokok enfeksiyonlarına yol açan feromon aracılı plazmid aktarımı gözlenmiştir (160, 161, 162). Bizim çalışmamızın sonuçları da bazı izolatların bu mekanizma aracılığıyla -ve belki de bu plazmidler aracılığıyla bazı antibiyotiklere karşı direnç kazanmış olabileceğini düşündürmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamıza 3 farklı merkezden kan kültüründen elde edilen toplam 45 *E. faecalis* (her merkezden 15'er) ve toplam 45 *E. faecium* (her merkezden 15'er) izolatı dahil edilmiştir. Bu isolatların elde edildikleri hastaların yaş, cinsiyet ve geldikleri branşlar gibi çeşitli demografik özellikler ve ortalama kan kültürü pozitifleşme süreleri değerlendirilmiş olup istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Yaş ve kan kültürü pozitifleşme süreleri bazı farklılıklar içermekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar içermemektedir. Cinsiyet açısından bakıldığında ise *E. faecalis* izolatlarının kadın hastalara kıyasla erkek hastalardan (istatistiksel olarak anlamlı şekilde) daha fazla elde edildiği gözlenmiştir.

İsolatlar antibiyotik duyarlılık paternleri açısından da değerlendirilmiştir. Tüm dünyada oldukça önemli bir sorun olarak görünen *E. faecium*'da vankomisin direnci literatürde kıyaslanan pek çok çalışmaya oranla daha yüksek bir oranda (%31,1) tespit edilmiş ve istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte merkezler arası farklar da gözlenmiştir. Gentamisin ve streptomisin, beta-laktam/glikopeptit ilaçlarla sinerjistik etkileşimleri nedeniyle enfektif endokardit gibi ciddi klinik tablolarda önemli tedavi seçenekleridir. Bizim çalışmamızda *E. faecalis*'te YDGD oranı %24,4 ve YDSD oranı %26,7 olarak bulunmuşken *E. faecium*'da ise YDGD oranı %66,7 ve YDSD oranı ise %77,8 olarak bulunmuştur. Bu direnç oranları özellikle *E. faecium*'da literatürde ülkemizde dahil olduğu DSÖ Avrupa bölgesi için belirlenen oranlardan oldukça yüksektir. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak *E. faecium* izolatlarında *E. faecalis* izolatlarına oranla test edilen tüm antibiyotiklerde (tetrasiklin, eravasiklin ve linezolid hariç) istatistiksel olarak anlamlı bir direnç yüksekliği görülmektedir. Önemli bir nokta hem YDGD hem de YDSD açısından merkezler arasında istatistiksel olarak anlamlı (Merkez 1'de anlamlı olarak düşük) farklılıklar bulunduğu. Bu da merkez bazlı antibiyotik sürveyans çalışmalarının önemine işaret etmektedir. Yine in vitro beta-laktam/glikopeptit ile aminoglikozit sinerji oranlarındaki merkez bazlı farklılıklar dikkat çekici olup bu da EE ve kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları gibi enfeksiyonlarda tercih edilecek tedavi rejimleri açısından belirleyici olabilecek bir husustur.

Çalışmamızda glikopeptit ve yüksek düzey aminoglikozit direncine neden olan genler fenotipik olarak dirençli izolatlarda konvansiyonel PZR ile değerlendirilmiş ve glikopeptit direnci açısından fenotipik direnci olan isolatların %100'ünde *vanA*, YDGD olan isolatların %92,7'sinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ve YDSD olan isolatların %95,6'sında *ant(6')-Ia* geni

tespit edilmiştir. Bu veriler direnç genlerinin homojen dağılımını ve bakteriyemi etkeni olan enterokoklarda YDGD'den çoğunlukla *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*; YDSD'den ise çoğunlukla *ant(6')-Ia* genlerinin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

Biyofilm oluşumunun enterokoklara bağlı enfektif endokardit, kateter ilişkili enfeksiyonlar ve üriner sistem enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlardaki önemi ile antimikrobiyal direnç üzerine etkileri yıllardır bilinmektedir. Bizim çalışmamızda *E. faecalis* izolatlarının %100'ü ve *E. faecium* izolatlarının %55,6'sı biyofilm formasyonu oluşturmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Yine *E. faecalis* izolatlarının *E. faecium* izolatlarına oranla daha güçlü biyofilmler oluşturduğu ve bu durum açısından merkezler arasında da farklılıklar olduğu (Merkez 1'de güçlü biyofilm oluşturma oranları daha yüksek) gözlenmiştir.

Biyofilm oluşumu çeşitli nedenlerle antimikrobiyal direncine neden olmaktadır. Çalışmamızda bu ilişki değerlendirilmiş ve *E. faecalis*'te güçlü biyofilm oluşturan izolatlarda siprofloksasin, yüksek düzey gentamisin ve yüksek düzey streptomisin direnç oranları orta veya zayıf güçte oluşturanlara kıyasla daha yüksek olarak tespit edilmişken bu farklılıklardan sadece YDGD için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. *E. faecium* için ise istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte siprofloksasin, kinupristin-dalfopristin ve YDG direnç oranları orta güçte biyofilm oluşturan izolatlarda zayıf veya hiç oluşturmayanlara kıyasla daha yüksek görülmüştür. Enterokoklarda özellikle *E. faecalis*'te feromon aracılı konjugasyonun özel ve önemli bir gen aktarımı mekanizması olduğu, biyofilm oluşumunun ise bu mekanizmanın gelişme ihtimalini artırdığı düşünülmektedir. Nitekim literatürde bu yolla gen aktarımı yapan plazmitlerle tetrasiklin, vankomisin ve YDG direnç genlerinin taşınabildiği gözlenmiştir. Bu konuyla ve plazmitlerle ilgili yapılacak araştırmaların bu mekanizmanın henüz fark edilmemiş direnç genlerinin aktarımında da rol alabildiğine dair önemli katkılar sunabileceği düşünülmektedir.

Eravasiklin özellikle VRE'lerde önemli bir tedavi seçeneği olabilecek florosiklin grubu yeni bir antibiyotiktir. Çalışmamızda ülkemiz literatüründe enterokoklarda henüz bildirilmemiş olan eravasiklin direncini disk difüzyon yöntemi ile 2 izolatta belirledik ve gradiyent difüzyon yöntemi ile doğruladık. Bu izolatların biri eravasiklin dirençli, tetrasiklin duyarlı iken diğeri her iki antimikrobiyale karşı dirençliydi. Enterokoklarda eravasiklin direnç oranlarının ülkemizde de çok merkezli ve geniş ölçekli çalışmalarla değerlendirilmesi ve dirence yol açan mekanizmaların tüm genom dizileme (TGD) ile araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M. The many faces of *Enterococcus* spp. commensal, probiotic and opportunistic pathogen. *Microorganisms* 9: 1900-1920, 2021.
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 48: 1-12, 2009.
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim: (https://www.eucast.org/expert_rules_and_expected_phenotypes). Erişim Tarihi: 02/10/2024.
4. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* 56: 1581-1588, 2007.
5. Monticelli J, Knezevich A, Luzzati R, Di Bella S. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus/flavescens*. *J Infect Chemother.* 24: 237-246, 2018.
6. Devriese LA, Van De Kerckhove A, Kilpper-Bälz R, Schleifer KH. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 37: 257-259, 1987.
7. Svec P, Sedláček I. Occurrence of *Enterococcus* spp. in waters. *Folia Microbiol.*;44: 3-10, 1999.
8. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev* 10: 266-274, 2012.
9. Nagao M. A multicentre analysis of epidemiology of the nosocomial bloodstream infections in Japanese university hospitals. *Clin Microbiol Infect.* 19: 852-858, 2013.
10. Deen J, von Seidlein L, Andersen F, Elle N, White NJ, & Lubell Y. Community-acquired bacterial bloodstream infections in developing countries in south and southeast Asia: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases.* 12: 480-487, 2012.
11. Erdem I, Ozgultekin A, Sengoz Inan A, Ozturk Engin D, Senbayrak Akcay S, Turan G, Dincer E, Oguzoglu N, Goktas P. Bloodstream infections in a medical-surgical

- intensive care unit: incidence, aetiology, antimicrobial resistance patterns of gram-positive and gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 15: 943-946, 2009.
12. Mataj V, Guney M, Sig AK, Uskudar-Guclu A, Albay A, Bedir O, Baysallar M. An Investigation into Bacterial Bloodstream Infections and Antibiotic Resistance Profiles in a Tertiary Hospital for a Ten-Year Period. *Clin Lab.* 66: 2020.
 13. Kajihara T, Nakamura S, Iwanaga N, Oshima K, Takazono T, Miyazaki T, Izumikawa K, Yanagihara K, Kohno N, Kohno S. Clinical characteristics and risk factors of enterococcal infections in Nagasaki, Japan: a retrospective study. *BMC Infect Dis.* 15: 426-434, 2015.
 14. Comerlato CB, Resende MCC, Caierão J, D'azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108: 590-595, 2013.
 15. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect.* 16: 533-540, 2010.
 16. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 2474-2477, 1993.
 17. Booth MC, Bogie CP, Sahl HG, Siezen RJ, Hatter KL, Gilmore MS. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol Microbiol.* 21: 1175-1184, 1996.
 18. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 42: 4473-4479, 2004.
 19. Gök ŞM, Türk Dağı H, Kara F, Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* izolatlarının antibiyotik direnci ve virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 54: 26-39, 2020.
 20. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence.* 5: 634-637, 2014.
 21. Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, Wagener MM, Muder RR. Association between the presence of enterococcal

- virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin Infect Dis. 35: 570-575, 2002.
22. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, Klare I, Nallapareddy SR, Huang W, Murray BE. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. J Infect Dis. 187: 508-512, 2003.
 23. Arias CA, Panesso D, Singh KV, Rice LB, Murray BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother. 53: 4240-4246, 2009.
 24. Wardal E, Sadowy E, Hryniewicz W. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. Pol J Microbiol. 59: 79-87, 2010.
 25. Francia MV, Weaver KE, Goicoechea P, Tille P, Clewell DB. Characterization of an active partition system for the *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1. J Bacteriol. 189: 8546-8455, 2007.
 26. Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuver M, Tribe D, Manzioros X, Gaillard C, Vandenbroucke-Grauls CM, Mascini EM, van Kregten E, van Embden JD, Bonten MJ. Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. Lancet. 357:853-855, 2001.
 27. Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. J Bacteriol. 189: 8233-8240, 2007.
 28. Heikens E, Singh KV, Jacques-Palaz KD, van Luit-Asbroek M, Oostdijk EA, Bonten MJ, Murray BE, Willems RJ. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. Microbes Infect. 13: 1185-1190, 2011.
 29. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J Clin Invest. 116: 2799-2807, 2006.
 30. Theilacker C, Kaczynski Z, Kropec A, Fabretti F, Sange T, Holst O, Huebner J. Opsonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. Infect Immun. 74: 5703-5712, 2006.

31. Malmartel A, Ghasarossian C. Epidemiology of urinary tract infections, bacterial species and resistances in primary care in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 35: 447-451, 2016.
32. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK; National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: 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. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 29: 996-1011, 2008.
33. Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, Rice JC, Schaeffer A, Hooton TM. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis.* 40: 643–654, 2005.
34. Chirouze C, Athan E, Alla F, Chu VH, Ralph Corey G, Selton-Suty C, Erpelding ML, Miro JM, Olaison L, Hoen B; International Collaboration on Endocarditis Study Group. Enterococcal endocarditis in the beginning of the 21st century: analysis from the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Clin Microbiol Infect.* 19: 1140-1147, 2013.
35. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P, Chambers ST, Chu VH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF, Utili R, Wang A, Woods CW, Cabell CH; International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study (ICE-PCS) Investigators. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study. *Arch Intern Med.* 169: 463-473, 2009.
36. Fernández Guerrero ML, Goyenechea A, Verdejo C, Roblas RF, de Górgolas M. Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves: a review of clinical and prognostic factors with emphasis on hospital-acquired infections as a major determinant of outcome. *Medicine.* 86: 363-377, 2007.
37. Cheriya P, Prasad A, Patel P, Vankeshwaram V, Seeburun S, Ghodasara K, Pavuluri S. Measuring Epidemiologic Effects of Enterococcal Bacteremia and Outcomes From a Nationwide Inpatient Sample Database. *Cureus.* 14: e27516, 2022.
38. Murray BE. Enterococci. In: *Infectious Disease.* (Gorbach, Bartlett, Blacklow ed). First edition. Philadelphia, WB Saunders. 1723-1730, 1998.

39. Moreno I, Cicinelli E, Garcia-Grau I, Gonzalez-Monfort M, Bau D, Vilella F, De Ziegler D, Resta L, Valbuena D, Simon C. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am J Obstet Gynecol.* 218: 602.e1-602.e16, 2018.
40. Holm SE, Mascini EM. Streptococci and Related Genera. In: *Infectious Disease.* (Armstrong D, Cohen J, ed). First edition. Barcelona, Mosby. 14.13-14.16, 1999.
41. Zak P, Vejrazkova E, Zavrelouva A, Pliskova L, Ryskova L, Hubacek P, Stepanova V, Kostal M, Koblizek V, Paterova P, Radocha J. BAL fluid analysis in the identification of infectious agents in patients with hematological malignancies and pulmonary infiltrates. *Folia Microbiol.* 65: 109-120, 2020.
42. McCarter YS, Burd EM, Hall GS, Zervos M. Cumitech 2C: Laboratory diagnosis of urinary tract infections. (Sharp SE). Coordinating edition. Washington DC, ASM Press, 2009.
43. Çolak D ve ark. Üriner sistem örneklerinin laboratuvar tanısı rehberi. İkinci baskı. Ankara, Klimud, 2020.
44. Oberhofer TR. Value of the L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hydrolysis test for identification of select gram-positive cocci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 4: 43-47, 1986.
45. Chuard C, Reller LB. Bile-esculin test for presumptive identification of enterococci and streptococci: effects of bile concentration, inoculation technique, and incubation time. *J Clin Microbiol.* 36: 1135-1136, 1998.
46. Hammonds SJ, Easterbrook TJ, McIlmmurray MB. Differentiation of enterococci from other group D streptococci by means of a specific monoclonal antibody. *FEMS Microbiol Lett.* 66: 91-94, 1991.
47. Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31: 3073-3077, 2012.
48. Williams AM, Rodrigues UM, Collins MD. Intrageneric relationships of Enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res Microbiol.* 142: 67-74, 1991.
49. Patel R, Piper KE, Rouse MS, Steckelberg JM, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR 3rd, Kline BC. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci

- and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. J Clin Microbiol. 36: 3399-3407, 1998.
50. Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, Pollock D, See I, Soe MM, Walters MS, Dudeck MA. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. Infect Control Hosp Epidemiol. 41: 1-18, 2020.
 51. Remschmidt C, Behnke M, Kola A, Peña Diaz LA, Rohde AM, Gastmeier P, Schwab F. The effect of antibiotic use on prevalence of nosocomial vancomycin-resistant enterococci- an ecologic study. Antimicrob Resist Infect Control. 6: 95-102, 2017.
 52. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024.
 53. Codelia-Anjum A, Lerner LB, Elterman D, Zorn KC, Bhojani N, Chughtai B. Enterococcal urinary tract infections: A review of the pathogenicity, epidemiology, and treatment. Antibiotics. 12: 778-788, 2023.
 54. Rašić Mišić I, Miletić G, Mitić S, Mitić M, Pecev-Marinković E. A simple method for the ampicillin determination in pharmaceuticals and human urine. Chem Pharm Bull. 61: 913-919, 2013.
 55. Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Noreddin A, Hisanaga T, Johnson JL, Hoban DJ; NAVRESS Group. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). J Antimicrob Chemother. 52: 382-388, 2003.
 56. Richey EM, Waters PW, Jovic M, Rakhman C. Treatment of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* Urinary Tract Infections. Fed Pract. 32: 20-23, 2015.
 57. Mutters NT, Werner G, Tacconelli E, Mischnik A. Treatment options for serious infections caused by vancomycin-resistant enterococci. Dtsch Med Wochenschr. 140: 42-45, 2015.
 58. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Tleyjeh IM, Rybak MJ, Barsic B, Lockhart PB, Gewitz MH, Levison ME, Bolger AF, Steckelberg JM, Baltimore RS, Fink AM, O'Gara P, Taubert KA; American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on

- Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Stroke Council. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications: A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 132: 1435-1486, 2015.
59. Farina C, Russello G, Chinello P, Pasticci MB, Raglio A, Ravasio V, Rizzi M, Scarparo C, Vailati F, Suter F; Italian Infective Endocarditis Study Group (SEI). In vitro activity effects of twelve antibiotics alone and in association against twenty-seven *Enterococcus faecalis* strains isolated from Italian patients with infective endocarditis: high in vitro synergistic effect of the association ceftriaxone-fosfomycin. *Chemotherapy*. 57: 426-433, 2011.
 60. Mendes RE, Sader HS, Castanheira M, Flamm RK. Distribution of main Gram-positive pathogens causing bloodstream infections in United States and European hospitals during the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010-2016): concomitant analysis of oritavancin in vitro activity. *J Chemother*. 30: 280-289, 2018.
 61. Cairns KA, Udy AA, Peel TN, Abbott IJ, Dooley MJ, Peleg AY. Therapeutics for Vancomycin-Resistant Enterococcal Bloodstream Infections. *Clin Microbiol Rev*. 36: e0005922, 2023.
 62. Jones ME, Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Nathwani D. Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 22: 406-419, 2003.
 63. O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist*. 8: 217-230, 2015.
 64. Sartelli M, Chichom-Mefire A, Labricciosa FM, Hardcastle T, Abu-Zidan FM, Adesunkanmi AK, Ansaloni L, Bala M, Balogh ZJ, Beltrán MA, Ben-Ishay O, Biffi WL, Birindelli A, Cainzos MA, Catalini G, Ceresoli M, Che Jusoh A, Chiara O, Coccolini F, Coimbra R, Cortese F, Demetrashevili Z, Di Saverio S, Diaz JJ, Egiev VN, Ferrada P, Fraga GP, Ghnnam WM, Lee JG, Gomes CA, Hecker A, Herzog T, Kim JI, Inaba K, Isik A, Karamarkovic A, Kashuk J, Khokha V, Kirkpatrick AW, Kluger Y, Koike K, Kong VY, Leppaniemi A, Machain GM, Maier RV, Marwah S, McFarlane ME, Montori G, Moore EE, Negoi I, Olaoye I, Omari AH, Ordonez CA, Pereira BM, Pereira Júnior GA, Pupelis G, Reis T, Sakakhushev B, Sato N, Segovia

- Lohse HA, Shelat VG, Søreide K, Uhl W, Ulrych J, Van Goor H, Velmahos GC, Yuan KC, Wani I, Weber DG, Zachariah SK, Catena F. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg.* 12: 29-62, 2017.
65. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 32: 361-385, 2008.
 66. Ono S, Muratani T, Matsumoto T. Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2954-2958, 2005.
 67. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 3: 421-433, 2012.
 68. Lamb HM, Figgitt DP, Faulds D. Quinupristin/dalfopristin: a review of its use in the management of serious gram-positive infections. *Drugs.* 58: 1061-1097, 1999.
 69. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 967-971, 2000.
 70. Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 3334-3336, 2002.
 71. Palmer KL, Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore MS. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 3345-56, 2011.
 72. Hoban DJ, Reinert RR, Bouchillon SK, Dowzicky MJ. Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004-2013. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 14:27, 2015.
 73. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, Hammerum AM, Schaffer K, Burns K, Murchan S, Novais C, Freitas AR, Peixe L, Del Grosso M, Pantosti A, Werner G. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resist Updat.* 40: 25-39, 2018.
 74. Boukthir S, Dejoies L, Zouari A, Collet A, Potrel S, Auger G, Cattoir V. In vitro activity of eravacycline and mechanisms of resistance in enterococci. *Int J Antimicrob Agents.* 56: 106215, 2020.

75. Cattoir V, Giard JC. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. Expert Rev Anti Infect Ther. 12: 239-248, 2014.
76. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim: (http://www.eucast.org/breakpoint_tables_for_interpretation_of_MICs_and_zone_diameters/v_15.0). Erişim Tarihi: 15/10/2025.
77. CLSI. Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Clinical Laboratory Standarts Institute; 2025.
78. Sharifzadeh Peyvasti V, Mohabati Mobarez A, Shahcheraghi F, Khoramabadi N, Razaz Rahmati N, Hosseini Doust R. High-level aminoglycoside resistance and distribution of aminoglycoside resistance genes among *Enterococcus* spp. clinical isolates in Tehran, Iran. J Glob Antimicrob Resist. 20: 318-323, 2020.
79. Kilbas I, Ciftci IH. Antimicrobial resistance of Enterococcus isolates in Turkey: A meta-analysis of current studies. J Glob Antimicrob Resist. 12: 26-30, 2018.
80. Serio AW, Keepers T, Andrews L, Krause KM. Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. EcoSal Plus. 8: 1-20, 2018.
81. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev. 57: 138-163, 1993.
82. Shete V, Grover N, Kumar M. Analysis of Aminoglycoside Modifying Enzyme Genes Responsible for High-Level Aminoglycoside Resistance among Enterococcal Isolates. J Pathog. 2017: 3256952, 2017.
83. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 16: 430-450, 2003.
84. Dressel DC, Tornatore-Reuscher MA, Boschman CR, Stosor V, Zembower T, Postelnick MJ, Noskin GA, Peterson LR. Synergistic effect of gentamicin plus ampicillin on enterococci with differing sensitivity to gentamicin: a phenotypic assessment of NCCLS guidelines. Diagn Microbiol Infect Dis. 35: 219-225, 1999.
85. Shrestha S, Kharel S, Homagain S, Aryal R, Mishra SK. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Asia-A systematic review and meta-analysis. J Clin Pharm Ther. 46:1226-1237, 2021.
86. Butler MS, Hansford KA, Blaskovich MA, Halai R, Cooper MA. Glycopeptide antibiotics: back to the future. J Antibiot. 67: 631-644, 2014.

87. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med. 90: 269-281, 2017.
88. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 37:1563-1571, 1993.
89. Tacconelli E, Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. Int J Antimicrob Agents. 31: 99-106, 2008.
90. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim: (https://www.eucast.org/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms/v_2.0). Erişim Tarihi: 27/11/2024.
91. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 8: 881-890, 2002.
92. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. (Dunny GM, Hancock LE, Shankar N, ed). First edition. Boston, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
93. Palmer RJ Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. Trends Microbiol. 5: 435-440, 1997.
94. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. Braz J Microbiol. 52: 1701-1718, 2021.
95. Ruhel R, Sahu A, Koujalagi T, Das A, Prasanth H, Kataria R. Biofilm-specific determinants of enterococci pathogen. Arch Microbiol. 206: 397-412, 2024.
96. Guerardel Y, Sadovskaya I, Maes E, Furlan S, Chapot-Chartier MP, Mesnage S, Rigottier-Gois L, Serror P. Complete Structure of the Enterococcal Polysaccharide Antigen (EPA) of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* V583 Reveals that EPA Decorations Are Teichoic Acids Covalently Linked to a Rhamnopolysaccharide Backbone. mBio. 11: e00277-20, 2020.
97. Donelli G, Guaglianone E. Emerging role of *Enterococcus* spp. in catheter-related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. J Vasc Access. 5: 3-9, 2004.
98. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 72: 3658-3663, 2004.
99. Guiton PS, Hannan TJ, Ford B, Caparon MG, Hultgren SJ. *Enterococcus faecalis* overcomes foreign body-mediated inflammation to establish urinary tract infections. Infect Immun. 81: 329-339, 2013.

100. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358: 135-138, 2001.
101. UK Health Security Agency. (2021). Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms. UK Standards for Microbiology Investigations. V 4 Issue 4.
102. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Bölüm 12: Gram pozitif koklar. Kısım 1: Stafilkoklar ve ilişkili Gram pozitif koklar. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Türkçe Baskısı (Başustaoğlu AC, Us AD, ed). 7. Baskı. Ankara, Hipokrat Yayınevi, 670-732, 2017.
103. Durmaz R, Eser Ö, Otlı B. Bölüm 12: Matrix-Assisted Laser Desorption-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Prensi ve Klinik Mikrobiyolojide Kullanımı. Kısım 2: Nükleik Asit ve Protein Temelli Yöntemler. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve Epidemiyoloji. 1. Baskı. Ankara, Akademisyen Kitabevi, 171-183, 2022.
104. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim: (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/v_13.0). Erişim Tarihi: 14/05/2025.
105. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim: (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/quality_control/v_15.0). Erişim Tarihi: 14/05/2025.
106. Aydemir Ş, Çöplü N, Gülay Z, et al. Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: uygulama, yorum ve uzman kuralları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 46 (Suppl.): 1-206, 2016.
107. Uskudar-Guclu A, Guney M, Sig AK, Kilic S, Baysallar M. Arising prevalence of oxa-48 producer *Escherichia coli* and OXA-48 with NDM co-producer *Klebsiella pneumoniae* strains. *Revista Romana de Medicina de Laborator*. 27: 319-326, 2019.
108. Uttley AH, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, Morrison D, Gilfillan AJ, Fitch LE, Heptonstall J. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol Infect*. 1989 Aug;103: 173-81, 1989.

109. Tenover FC, Tokars J, Swenson J, Paul S, Spitalny K, Jarvis W. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 31: 1695-1699, 1993.
110. Swenson JM, Clark NC, Sahm DF, Ferraro MJ, Doern G, Hindler J, Jorgensen JH, Pfaller MA, Reller LB, Weinstein MP, et al. Molecular characterization and multilaboratory evaluation of *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 for quality control of screening tests for vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol.* 33: 3019-3021, 1995.
111. Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42: 5857-5860, 2004.
112. Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM, Zervos MJ, Lerner SA, Chow JW. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 47: 1423-1426, 2003.
113. Lee YJ, Kim K, Lee YJ. Dissemination and characteristics of high-level erythromycin-resistant *Enterococcus faecalis* from bulk tank milk of dairy companies in Korea. *Can J Vet Res.* 87: 51-58, 2023.
114. Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect.* 126: 197-204, 2001.
115. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115: 891-899, 2007.
116. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods.* 40: 175-179, 2000.
117. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol.* 10: 1-19, 1987.
118. Dai Z, Chen LY, Cai MJ, Yao YH, Zhu JH, Fang LL, Tang R, Liang XM. Clinical characteristics and microbiology of nosocomial enterococcal bloodstream

- infections in a tertiary-level hospital: a retrospective study, 2007-2019. *J Hosp Infect.* 122: 203-210, 2022.
119. Hornuss D, Göpel S, Walker SV, Tobys D, Häcker G, Seifert H, Higgins PG, Xanthopoulou K, Gladstone BP, Cattaneo C, Mischnik A, Rohde AM, Imirzalioglu C, Trauth J, Fritzenwanker M, Falgenhauer J, Gastmeier P, Behnke M, Kramme E, Käding N, Rupp J, Peter S, Schmauder K, Eisenbeis S, Kern WV, Tacconelli E, Rieg S; DZIF R.-N. E. T. Study Group. Epidemiological trends and susceptibility patterns of bloodstream infections caused by enterococcus spp. in six German university hospitals: a prospectively evaluated multicentre cohort study from 2016 to 2020 of the R-Net study group. *Infection.* 52: 1995-2004, 2024.
 120. Correa-Martínez CL, Schuler F, Kampmeier S. Sex differences in vancomycin-resistant enterococci bloodstream infections-a systematic review and meta-analysis. *Biol Sex Differ.* 12: 36-37, 2021.
 121. Zhu Q, Yue Y, Zhu L, Cui J, Zhu M, Chen L, Yang Z, Liang Z. Epidemiology and microbiology of Gram-positive bloodstream infections in a tertiary-care hospital in Beijing, China: a 6-year retrospective study. *Antimicrob Resist Infect Control.* Sep 7: 107-116, 2018.
 122. Scharloo F, Cogliati Dezza F, López-Hernández I, Martínez Pérez-Crespo PM, Goikoetxea Aguirre AJ, Pérez-Rodríguez MT, Fernandez-Suarez J, León Jiménez E, Morán Rodríguez MÁ, Fernández-Natal I, Reguera Iglesias JM, Natera Kindelán C, Fariñas Álvares MC, Boix-Palop L, Lopez-Cortes LE, Rodríguez-Baño J; PROBAC/GEIRAS-SEIMC/SAMICEI group. Clinical characteristics, predisposing factors and outcomes for *Enterococcus faecalis* versus *Enterococcus faecium* bloodstream infections: a prospective multicentre cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 43: 2011-2022, 2024.
 123. Miller L, Hunt JS. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sci.* 59: 1-14, 1996.
 124. Sahu LS, Dash M, Paty BP, Purohit GK, Chayani N. Enterococcal infections and antimicrobial resistance in a tertiary care hospital, Eastern India. *Afro-Egypt J Infect Endem Dis.* 5: 255-264, 2015.
 125. Aykut Arca E, Mert Dinç B, Karabiber N. Distribution to clinics of Enterococci species isolated from various clinical samples. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 66: 1-5, 2009.

126. Rowe TA, Juthani-Mehta M. Urinary tract infection in older adults. *Aging health*. 9: 10-25, 2013.
127. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, Laplanche A, Brun-Buisson C, Tancrede C. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet*. 354: 1071-1077, 1999.
128. Robson C, Khan H, Junckerstorff RK, Graham M, Stuart RL, Nicholls SJ, Rogers BA. The relationship between blood culture time-to-positivity and *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Pathology*. 6: S0031-3025(25)00179-5, 2025.
129. Michelson K, Löffler B, Höring S. Time to positivity as a prognostic factor in bloodstream infections with *Enterococcus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Nov;101(3):115396.
130. Diekema DJ, Hsueh PR, Mendes RE, Pfaller MA, Rolston KV, Sader HS, Jones RN. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 63: e00355-19, 2019.
131. Schöneweck F, Schmitz RPH, Reißner F, Scherag A, Löffler B, Pletz MW, Weis S, Brunkhorst FM, Hagel S. The epidemiology of bloodstream infections and antimicrobial susceptibility patterns in Thuringia, Germany: a five-year prospective, state-wide surveillance study (AlertsNet). *Antimicrob Resist Infect Control*. 10: 132-140, 2021.
132. Koca O, Er H, Çekin Y. Evaluation of antibiotic susceptibility in enterococci isolated from blood culture samples. *J Med Palliat Care*. 4: 385-388, 2023.
133. Şanlı K, Mart Kömürcü SZ, Şahin AS. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus Faecalis* and *Enterococcus Faecium* Grown in Adult Intensive Care Patients Blood Cultures. *İKSSTD*. 14: 268-273, 2022.
134. Guan L, Beig M, Wang L, Navidifar T, Moradi S, Motallebi Tabaei F, Teymouri Z, Abedi Moghadam M, Sedighi M. Global status of antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates: systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 23: 80-96, 2024.
135. Huang C, Moradi S, Sholeh M, Tabaei FM, Lai T, Tan B, Meng J, Azizian K. Global trends in antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis of clinical isolates. *Front Pharmacol*. 16: 1505674, 2025.

136. Morrissey I, Hawser S, Lob SH, Karlowsky JA, Bassetti M, Corey GR, Olesky M, Newman J, Fyfe C. *In Vitro* Activity of Eravacycline against Gram-Positive Bacteria Isolated in Clinical Laboratories Worldwide from 2013 to 2017. *Antimicrob Agents Chemother.* 64: e01715-19, 2020.
137. Valzano F, Beccia E, La Bella G, Marangi M, Arena F. The Y58D mutation in *rpsJ* gene is correlated with tigecycline and eravacycline combined resistance in ST80 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J Glob Antimicrob Resist.* 43: 242-247, 2025.
138. Beabout K, Hammerstrom TG, Perez AM, Magalhães BF, Prater AG, Clements TP, Arias CA, Saxer G, Shamoo Y. The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 59: 5561-5566, 2015.
139. Liao X, Liang Q, Dai X, Wu S, Duan C, Luo Z, Xie X. *In vitro* activities of eravacycline against clinical bacterial isolates: a multicenter study in Guangdong, China. *Front Microbiol.* 15: 1504013, 2024.
140. Mathew SK. A profile of vancomycin-resistant enterococcal infections and a comparison of resistance detection methods. *Indian J Microbiol Res.* 5: 408-414, 2018.
141. Ayobami O, Willrich N, Reuss A, Eckmanns T, Markwart R. The ongoing challenge of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. *Emerg Microbes Infect.* 9 :1180-1193, 2020.
142. Yazgi H, Ertek M, Erol S, Ayyildiz A. A comparison of high-level aminoglycoside resistance in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J Int Med Res.* 30: 529-534, 2002.
143. Tomita H, Pierson C, Lim SK, Clewell DB, Ike Y. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 40: 3326-3333, 2002.
144. Sun L, Xu J, Wang W, He F. Emergence of *vanA*-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* ST 78 Strain with a *rep2*-Type Plasmid Carrying a Tn1546-Like Element Isolated from a Urinary Tract Infection in China. *Infect Drug Resist.* 13: 949-955, 2020.

145. Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG Jr, Bolger AF, Levison ME, Ferrieri P, Gerber MA, Tani LY, Gewitz MH, Tong DC, Steckelberg JM, Baltimore RS, Shulman ST, Burns JC, Falace DA, Newburger JW, Pallasch TJ, Takahashi M, Taubert KA; Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia; American Heart Association; Infectious Diseases Society of America. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Councils on Clinical Cardiology, Stroke, and Cardiovascular Surgery and Anesthesia, American Heart Association: endorsed by the Infectious Diseases Society of America. *Circulation*. 111: e394-434, 2005.
146. Beigverdi R, Sattari-Maraji A, Jabalameli F, Emaneini M. Prevalence of Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Clinical Isolates of Gram-Positive Cocci in Iran: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Microb Drug Resist*. 26: 126-135, 2020.
147. Aslangul E, Massias L, Meulemans A, Chau F, Andremont A, Courvalin P, Fantin B, Ruimy R. Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 50: 3615-3621, 2006.
148. Solomon KA, Brusilow WS. Effect of an uncE ribosome-binding site mutation on the synthesis and assembly of the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase. *J Biol Chem*. 263: 5402-5407, 1988.
149. Buckel P, Buchberger A, Böck A, Wittmann HG. Alteration of ribosomal protein L6 in mutants of *Escherichia coli* resistant to gentamicin. *Mol Gen Genet*. 158: 47-54, 1977.
150. Osuka H, Nakajima J, Oishi T, Funayama Y, Ebihara T, Ishikawa H, Saito K, Koganemaru H, Hitomi S. High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. *J Infect Chemother*. 22: 61-63, 2016.
151. Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. Gene homogeneity for aminoglycoside-modifying enzymes in gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother*. 34: 2164-2168, 1990.

152. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A; European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19: 816-822, 2000.
153. Erdem F, Kayacan C, Oncul O, Karagoz A, Aktas Z. Clonal distribution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Turkey and the new singleton ST733. *J Clin Lab Anal*. 34: e23541, 2020.
154. Yang JX, Liu CW, Wu FW, Zhu L, Liang GW. Molecular characterization and biofilm formation ability of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bloodstream isolates from a Chinese tertiary hospital in Beijing. *Int Microbiol*. 27: 929-939, 2024.
155. Tamrat E, Asmare Z, Geteneh A, Sisay A, Getachew E, Kassanew B, Dessale M, Gashaw Y, Jemal A, Gashaw M, Bazezew A, Gedfie S, Kassahun W, Abebe W, Dejazmach Z, Misganaw T, Ashagre A, Nigatie M, Damtie AA, Alemu BB, Tefera Z, Mezgebu B, Kumie G, Kiros M, Reta MA. The global prevalence of biofilm-forming *Enterococcus faecalis* in clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 25: 981-999, 2025.
156. Zheng JX, Bai B, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng XB, Deng QW, Yu ZJ. Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *J Med Microbiol*. 67: 60-67, 2018.
157. Sarı N, Kurt NT, Arslan H, Azap ÖK. Enterokok Bakteriyemileri: Son 5 Yılda *E. faecium* ve *E. faecalis*'in Direnç Profili ve Prognoza Etkisi. *Turk J Clin Lab*. 1: 131-139, 2025.
158. Ghazvinian M, Asgharzadeh Marghmalek S, Gholami M, Amir Gholami S, Amiri E, Goli HR. Antimicrobial resistance patterns, virulence genes, and biofilm formation in enterococci strains collected from different sources. *BMC Infect Dis*. 24:274-286, 2024.
159. Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*. 13: 632-639, 2010.
160. Hirt H, Manias DA, Bryan EM, Klein JR, Marklund JK, Staddon JH, Paustian ML, Kapur V, Dunny GM. Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. *J Bacteriol*. 187:1044-1054, 2005.

161. Zheng B, Tomita H, Inoue T, Ike Y. Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, Encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrob Agents Chemother.* 53: 735-747, 2009.
162. Ma X, Kudo M, Takahashi A, Tanimoto K, Ike Y. Evidence of nosocomial infection in Japan caused by high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and identification of the pheromone-responsive conjugative plasmid encoding gentamicin resistance. *J Clin Microbiol.* 36: 2460-2464, 1998.



8. EKLER

8.1. Turnitin Uygulamasından Alınan Benzerlik İndeksi Raporu

Turnitin öğrenci ödevleri, projeleri ve tezlerinde intihalleri ve usülsüz alıntıları engellemek amacıyla kullanılan web tabanlı bir yazılımdır. Çalışmamızın bu yazılım aracıyla hesaplanan benzerlik indeksi oranı %8'dir. Benzerlik indeksi raporunun ilk sayfası aşağıda sunulmuştur.

Tez Turnitin			
ORJİNALLİK RAPORU			
%8	%6	%5	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2	
2	abis-files.kocaeli.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
3	Submitted to Baskent University Öğrenci Ödevi	<%1	
4	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	<%1	
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1	
6	core.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1	
7	www.tmc-online.org İnternet Kaynağı	<%1	