

Enterokok Türlerinin Virulans Faktörlerinin Araştırılması

Evaluation of Virulence Factors in Enterococcus Species

Ergun METE¹, İlknur KALELİ¹, Nural CEVAHİR¹, Melek DEMİR¹, Yüksel AKKAYA¹, Özgün KIRIŞ SATILMIŞ¹

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

* Bu çalışma XXXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2016, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 28.09.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 05.04.2017

ÖZ

Enterokoklar son zamanlarda toplum kaynaklı ve nozokomiyal enfeksiyonlarda izolasyon oranlarının artması ve glikopeptidler de dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş olmaları nedeniyle önemli hale gelmiştir. Bu çalışmada hastanemizdeki idrar (n= 149), kan (n= 38), yara (n= 17), gaita (n= 13) ve diğer (n= 12) çeşitli klinik örneklerden izole edilen 138'i *Enterococcus faecalis*, 91'i *Enterococcus faecium* olan 229 enterokok izolatının virulans faktörlerinin ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için agregasyon faktörü (AF)'nü, enterokok yüzey proteinini (*esp*), sitolizinleri ve jelatinazı kodlayan genler (sırasıyla *asa1*, *esp*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylL_L*, *cylL_S*, *gelE*) moleküler yöntemlerle araştırılmış, ayrıca hemolizin üretimi ve jelatinaz varlığı fenotipik olarak çalışılmıştır. Yirmi dokuz *E.faecium* ve bir *E.faecalis* izolatı olmak üzere toplam 30 izolat vankomisine dirençli olarak bulunmuştur. Çalışmamızda *E.faecium* izolatlarında yüksek düzey gentamisin (YDG) ve yüksek düzey streptomisin (YDS) direnci sırasıyla %40.7 ve %63.7 iken, *E.faecalis* izolatlarında sırasıyla %47.1 ve %55.8 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda tüm izolatlar linezolidde duyarlı bulunmuştur. Ampisilin, penisilin ve vankomisine *E.faecium* izolatlarının *E.faecalis* izolatlarına göre daha dirençli (p= 0.001, p= 0.008 ve p< 0.001) oldukları saptanmıştır. *E.faecalis* izolatlarında *asa1* (p< 0.001), *cylL_L* (p= 0.002) ve *cylL_S* (p< 0.001) gen pozitifliğinin yanı sıra jelatinaz aktivitesi *E.faecium* izolatlarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p< 0.001). Çalışmamıza dahil edilen izolatlarda en sık virulans genleri olarak *asa1* (%45), *cylL_S* (%33.2) ve *esp* (%32.3) geni saptanmıştır. Siprofloksasine direnç oranları, *cylL_L* ve *cylL_S* geni pozitif *E.faecalis* izolatlarında bu genleri içermeyen izolatlarla göre sırasıyla p= 0.035 ve p= 0.047 şeklinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı şekilde, hemolizin üreten *E.faecium* izolatlarında vankomisin direnci, hemolizin üretmeyenlere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p< 0.001). Vankomisin dirençli ve duyarlı izolatların virulans faktörleri karşılaştırıldığında; vankomisin dirençli enterokok (VRE) *E.faecium* izolatlarında *esp* gen düzeyi %24.1 olarak bulunurken, VRE *E.faecalis* izolatlarında *esp* geni bulunamamıştır. *Asa1* hem VRE *E.faecium* hem de VRE *E.faecalis* izolatlarında pozitif bulunamamıştır. Hemoliz inaktivitesi *E.faecalis* için %42.3, *E.faecium* için %19.3 pozitif bulunmuştur. Vankomisin duyarlı enterokok (VSE) izolatlarında ise, *esp* gen varlığı *E.faecalis*

İletişim (Correspondence): Dr. Ergun Mete, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kınıklı, Denizli, Türkiye.

Tel (Phone): +0 90 258 296 2455, E-posta (E-mail): ergunmete@pau.edu.tr

için %35.1, *E.faecium* için %29.4, *asa1* gen varlığı *E.faecalis* için %60.8, *E.faecium* için %47.1, hemolizin aktivitesi *E.faecalis* için %52.8, *E.faecium* için %23.5 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda VSE izolatlarının VRE izolatlarından daha fazla virülans genine sahip olduğu bulunmuştur. VRE, özellikle hastanede yatan hastalarda tedavisi zor enfeksiyonlara, VSE'nin ise önemli virülans faktörlerine sahip olması nedeniyle ciddi enfeksiyonlara sebep olabileceği akılda tutulmalıdır.

Anahtar sözcükler: Enterokok türleri; virülans faktörleri; antimikrobiyal direnç; vankomisin dirençli enterokok.

ABSTRACT

Enterococci have recently become important due to their increased isolation rates in community-based and nosocomial infections and resistance to many antibiotics, including glycopeptides. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptible patterns and virulence factors of various clinical specimens; urine (n= 149), blood (n= 38), wound (n= 17), stool (n= 13), and other (n= 12) with a total of 229 enterococci including 138 *E.faecalis* and 91 *E.faecium* isolates. Aggregation factor (AF), enterococcus surface protein (*esp*), cytolysins and gelatinase encoding genes (*asa1*, *esp*, *cylM*, *cylBcyl A*, *cylIII*, *cyls*, *gelE*, respectively) were investigated by molecular methods. Haemolysin production and gelatinase were studied phenotypically. A total of 30 isolates, 29 of *E.faecium* and one of *E.faecalis* isolates were resistant to vancomycin. High-level gentamicin and high-level streptomycin resistance in *E.faecalis* were 40.7% and 63.7% however, they were 47.1% and 55.8% in *E.faecalis* isolates. All strains were susceptible to linezolid. Ampicillin, penicillin and vancomycin resistance in *E.faecium* isolates were found to be higher than *E.faecalis* isolates ($p= 0.001$, $p= 0.008$ and $p< 0.001$). *Asa1* ($p< 0.001$), *cylIII* ($p= 0.002$) and *cyls* ($p< 0.001$) as well as gelatinase activity in isolates of *E.faecalis* were significantly higher than the isolates of *E.faecium* ($p< 0.001$). The most common virulence genes in our study were *asa1* gene (45%), *cyls* gene (33.2%) and *esp* gene (32.3%). Ciprofloxacin resistance in *cylIII* and *cyls* gene positive isolates of *E.faecalis* were significantly higher compared to isolates that do not contain these genes ($p= 0.035$ and $p= 0.047$). Likewise, haemolysin producing *E.faecium* isolates were significantly more resistant to vancomycin compared to isolates that do not produce hemolysin ($p< 0.001$). When the virulence factors of vancomycin resistant and susceptible isolates were compared, the *esp* gene level in VRE *E.faecium* isolates was found to be 24.1%, while no *esp* gene was found in VRE *E.faecalis* isolates. The existence of *asa1* was negative in both VRE *E.faecium* and VRE *E.faecalis* isolates. The activity of hemolysin was found 42.3% for *E.faecalis* and 19.3% for *E.faecium*. In vancomycin-sensitive enterococcus (VSE) species, *esp* gene activity was 35.1% for *E.faecalis*, 29.4% for *E.faecium*, *asa1* gene activity was 60.8% for *E.faecalis* and 47.1% for *E.faecium*, hemolysin activity was 52.8% for *E.faecalis* and 23.5% for *E.faecium*. In our study, it was found that VSE isolates have more virulence genes than VRE isolates. It should be kept in mind that VRE can cause infections which are difficult-to-treat especially in hospitalized patients and VSE have significant virulence factors that can cause severe infections.

Keywords: *Enterococcus spp.*; virulence factors; antimicrobial resistance; vancomycin resistant enterococci.

GİRİŞ

Enterokok, ağız boşluğu, bağırsak ve kadın genital sistemi normal flora üyesi olarak yer almakla birlikte, fırsatçı patojen olarak endokardit, septisemi gibi ciddi enfeksiyonların önemli etkenleri arasında bulunan ve sık izole edilen nozokomial bir patojendir^{1,2}.

Enterokoklara bağlı ciddi enfeksiyonların sebebi, adezyon ve salgısal virülans genlerinin varlığından kaynaklanmaktadır. Virülans faktörleri konak dokuya yapışma, kolonizasyon, invazyonu artırmak ve konak bağışıklık sisteminin modülasyonunu gerçekleştirmek yoluyla enfeksiyonun şiddetini artırır ve enterokok enfeksiyonlarının patogeneze katkısında bulunur¹.

Sitolizin (hemolizin/bakteriyosin) sistemi enfeksiyon modellerinde bakteri virülansına katkı sağlayan ekstraselüler ürünün üretimine yol açar³. Sitolizinler *cyIR1*, *cyIR2*, *cyILL*, *cyLS*, *cyIM*, *cyLB*, *cyIA* ve *cyII* olarak tanımlanan sekiz genin kontrolünde üretilirler⁴. Sitolizin aynı zamanda hemolizin olarak adlandırılır. Sitolizinler, *E.faecalis*'in birçok klinik izolatları tarafından üretilen, L ve S sitolizin olarak adlandırılan iki posttranslasyonel modifiye peptitlerdir. Bu peptitler, bağışıklık hücreleri de dahil olmak üzere ökaryotik hücrelerde litik aktiviteye sahiptir. *E.faecalis* sitolizini ile ilgili birçok çalışma, bu molekülün deneysel modellerde enfeksiyonu şiddetlendirdiğini göstermektedir⁵.

E.faecalis'in indüklenebilir yüzey proteini olan, *asa1* geni tarafından kodlanan agregasyon faktörü; ökaryotik hücrelere adezyon ve konjugasyon sırasında hücreler arası temas için gereklidir. Agregasyon faktörü enterokokların nötrofil, kalp, endokard ve böbrek epitel hücreleri gibi çeşitli ökaryotik hücre yüzeylerine adezyonunu artırır. *Esp* geni tarafından kodlanan hücre dışı yüzey proteini (*esp*), hücre duvarı ilişkili bir proteindir. Enterokokların kolonizasyonu ve artmış virülansı ile ilişkilidir⁶. Konağın bağışıklık sisteminden bakteriyi koruduğu düşünülen *esp*'nin üriner sistemde kolonizasyonu arttırdığı bilinmektedir¹.

Jelatinaz, ekstraselüler çinko içeren metalloproteinazdır ve konak dokusunu yıkıma uğratarak bakteriyeye besin sağlar. Aynı zamanda, biyofilm oluşumunda fonksiyonu vardır⁷. Enterokokların yüksek düzey aminoglikozit direnci (HLAR) tedavide sorunlara yol açmaktadır. Aminoglikozit dirençli izolatlar genellikle aminoglikozit modifiye eden enzimleri kodlayan plazmit kaynaklı genlerin kazanılması sonucu ortaya çıkar. Ayrıca, bu genlerin çoğu türler arasında ilaç direncinin hızlı yayılmasına yardım eden transpozonlarla ilişkilidir⁸.

Bu çalışmada hastanemizdeki çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokokların antibiyotik duyarlılık paternleri ile virülans faktörlerinin birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatları

Çalışmaya, hastanemizdeki çeşitli klinik örneklerden izole edilen gram-pozitif kok morfolojisinde, katalaz-negatif, eskulin besiyerini karartan, %6.5'lik NaCl içeren besiyerinde üreyebilen ve PYR testi pozitif olması nedeniyle cins düzeyinde enterokok olarak tanımlanan 229 bakteri alındı. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması, VITEK 2 Compact (bioMerieux, Fransa) otomatize sisteminin GP kolorimetrik tanımlama kartları kullanılarak yapıldı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Tür düzeyinde tanımlanan enterokokların antibiyotiklere direnç durumları, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"⁹ önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Mueller Hinton agar besiyeri kullanılarak araştırıldı. Vankomisin dirençli bulunan izolatlarda agar gradient yöntemi (Etest-bio-Merieux, Fransa) ile MİK değerleri çalışıldı ve vankomisin direnci doğrulanmış olan izolatlar VRE olarak kabul edildi.

Virulans Faktörlerinin Saptanması

Enterokok izolatlarının *esp*, *asa1*, *cyl* (*cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylL_L*, *cylL_S*) ve *gelE* virulans genlerinin varlığı daha önce tanımlanmış olan in-house polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırıldı. Araştırılan gen bölgeleri ve kullanılan primerler Tablo I'de verilmiştir.

Agregasyon Faktörü, Enterokal Yüzey Proteini, Jelatinaz Genlerinin Varlığının Araştırılması

Daha önce tanımlanmış olan PCR yöntemi ile *asa1*, *esp* ve *gelE* genlerinin varlığı araştırıldı¹⁰⁻¹². *asa1*, *esp* ve *gelE* içinde fibrine %5'lik koyun kanı ile zenginleştirilmiş Columbia agarın bir gecelik inkübasyonu sonrasında oluşan kolonilerden alınan birkaç koloni bakteri, 1 µl steril distile su içinde süspansedildi. Her bir primerden 20 pmol alınarak 25 µl'lik hacime tamamlandı. PCR amplifikasyon koşulları Tablo II'de verilmiştir.

Sitolizin Genlerinin Varlığının Araştırılması

Sitolizin operonlarının 5 non-regülatör geni (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL_L* ve *cylL_S*) Eaton ve Gasson¹³ (*cylA*, *cylB*, *cylM*), Semedo ve arkadaşları¹⁴ (*cylL_L*) ve Hallgren ve arkadaşlarının¹⁵ (*cylL_S*) tanımladıkları primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu ile tespit edildi. Her bir primerden 5-10 pmol alınarak ve defibrine %5'lik koyun kanı ile zenginleştirilmiş Columbia agarın bir gecelik inkübasyonu sonrasında oluşan kolonilerden alınan birkaç koloni bakteri, 1 µl steril distile su içinde süspansedilerek 25 µl'lik hacime tamamlandı. PCR amplifikasyon koşulları Tablo II'de verilmiştir.

PCR amplikonları, etidyum bromür ile boyandı ve agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

Tablo I. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *asa1*, *esp*, *gelE* ve Sitolizin Gen Bölgelerinin Taranmasında Kullanılan Primerler

Gen Bölgesi	Primer	Sekans(5' to 3')	Baz çifti (bç)	Referans
<i>asa1</i>	Agg1 (forward)	5'-ggt gcc aca ate aaa tta gg-3'	379	Huycke ve Gilmore ¹⁰ (1995)
	Agg2 (reverse)	5'-gat tct teg att gtg ttg taa acg-3'		
<i>esp</i>	Esp 11 (forward)	5' ttg eta atg eta gtc cac gacc 3'	954	Shankar ve ark ¹¹ (1999)
	Esp 12 (reverse)	5'-gcg tea aca ctt gca ttg ccg aa-3'		
<i>cylM</i>	TE13 (forward)	5'-ctg atg gaa aga aga tag tat-3'	742	Eaton ve Gasson ¹² (2001)
	TE14 (reverse)	5'-tga gtt ggt ctg att aca ttt-3'		
<i>cylB</i>	TE15 (forward)	5'-att cct ace tat gtt ctg tta-3'	843	Eaton ve Gasson ¹² (2001)
	TE16 (reverse)	5'-aat aaa etc ttc ttt tec aac-3'		
<i>cylA</i>	TE17 (forward)	5'-tgg atg ata gtg ata gga agt-3'	517	Eaton ve Gasson ¹² (2001)
	TE18 (reverse)	5'-tct aca gta aat ctt teg tca-3'		
<i>cylL_L</i>	CylL _L 1 (forward)	5'-gat gga ggg taa gaa tta tgg-3'	253	Semedo ve ark ¹³ (2003)
	CylL _L 2 (reverse)	5'-gct tea cct cac taa gtt tta tag-3'		
<i>cylL_S</i>	CylL _S 1 (forward)	5'- tgc taa ata agg aaa ate aag-3'	157	Hallgren ve ark ¹⁴ (2009)
	CylL _S 2 (reverse)	5'-cct aag cct atg gta aaa ca-3'		
<i>gelE</i>	gel E1 (forward)	5'-agt tca tgt cta ttt tctt cac-3'	402	Mannu ve ark ¹⁵ (2003)
	gel E2 (reverse)	5'-ctt cat tat tta cac gtt tg-3'		

Tablo II. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyon Koşulları

Gen	Başlangıç denatürasyon		Denatürasyon		Bağlanma		Uzama		Döngü sayısı	Son Uzama	
	Isı (°C)	Zaman (dk)	Isı (°C)	Zaman (sn)	Isı (°C)	Zaman (sn)	Isı (°C)	Zaman (sn)		Isı (°C)	Zaman (sn)
<i>asa1</i>	95	10	95	45	46	45	72	60	25	72	10
<i>esp</i>	95	10	94	45	63	45	72	60	30	72	10
<i>cylA + cylL_s</i>	94	15	94	60	52	60	72	120	30	72	10
<i>cylM + cylL_L</i>	94	15	94	60	52	60	72	120	30	72	10
<i>cylB</i>	94	15	94	60	52	60	72	120	30	72	10
<i>gelE</i>	94	10	94	60	56	60	72	60	30	72	10

Virulans Faktörlerinin Fenotipik Olarak Araştırılması

Hemolizin üretimi, %5 defibrine koyun kanı eklenmiş Colombia kanlı agar (Oxoid, İngiltere) kullanılarak tespit edildi. Plaklara ekilen izolatlardaki hemolizin varlığı, 37°C'de, 48 saat inkübasyondan sonra kolonilerin etrafında beta-hemolitik reaksiyon oluşumuyla saptandı¹³. Jelatinaz aktivitesi ise %1.5 "skim milk" ile zenginleştirilmiş triptik soy agarda (Oxoid, İngiltere) üreyen koloniler etrafında berrak bir halo görülmesi ile saptandı¹⁶.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, SPSS for Windows Version 21.0 (SPSS Inc., ABD) kullanılarak yapıldı. Direnç oranları ve virulans faktörlerinin dağılımı, ki-kare ve Fisher kesin testi ile karşılaştırıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 229 enterokok izolatının 138 (%60.3)'i *E.faecalis*, 91 (%39.7)'i *E.faecium* olarak belirlenmiştir. Enterokok izolatlarının test edilen antibiyotiklere direnç durumları Tablo III'te sunulmuştur.

Çalışmamızda tüm izolatlar linezolidde duyarlı bulunmuştur. *E.faecium* izolatlarının *E.faecalis* izolatlarına göre ampisilin, penisilin ve vankomisine daha dirençli ($p = 0.001$, $p = 0.008$ ve $p < 0.001$) oldukları saptanmıştır. *E.faecium* izolatlarının, ampisilin (%76.9), penisilin (%80.2) ve vankomisin (%31.9)'in yanı sıra yüksek düzey gentamisin (%40.7) ve yüksek düzey streptomisin (%63.7)'e dirençli oldukları saptanmıştır (Tablo III). Hem YDG hem de YDS direnci gösteren izolatların oranı, *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatları içinde sırasıyla %38.5 (35/91) ve %41.3 (57/138) olarak saptanmıştır. Vankomisin dirençli enterokok izolatlarının diğer antibiyotiklere direnç durumları Tablo IV'te verilmiştir.

Örneklere ve enterokok türlerine göre virulans faktörlerinin dağılımı Tablo V'te verilmiştir. Çalışmamızda, en sık virulans genleri olarak *asa1* (%45), *cylLS* (%33.2) ve *esp* (%32.3) geni saptanmıştır. İstatistiksel analizde, *E.faecalis* izolatlarında *asa1* ($p < 0.001$), *cylL_L* ($p = 0.002$) ve *cylL_S* ($p < 0.001$) gen pozitifliğinin yanı sıra jelatinaz aktivitesi *E.faecium* izolatlarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tablo III. Enterokok İzolatlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları

	<i>E.faecalis</i> (n= 138)			<i>E.faecium</i> (n= 91)			p
	S	R	I	S	R	I	
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	
Ampisilin	61 (44.2)	76 (55.1)	1 (0.7)	21 (23.1)	70 (76.9)	0	p= 0.001
Penisilin	50 (36.2)	87 (63.1)	1 (0.7)	18 (19.8)	73 (80.2)	0	p= 0.008
Vankomisin	137 (99.3)	1 (0.7)	0	62 (68.1)	29 (31.9)	0	p< 0.001
Gentamisin ^{YD}	73 (52.9)	65 (47.1)	0	52 (57.1)	37 (40.7)	2 (2.2)	p= 0.528
Streptomisin ^{YD}	61 (44.2)	77 (55.8)	0	32 (35.2)	58 (63.7)	1 (1.1)	p= 0.173
Siprofloksasin	38 (27.5)	92 (66.7)	8 (5.8)	17 (18.7)	70 (76.9)	4 (4.4)	p= 0.125
Linezolid	138 (100)	0	0	91 (100)	0	0	NA

S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli; YD: Yüksek düzey; NA: Uygulanamadı.

Tablo IV. Vankomisin Dirençli Enterokok İzolatlarının Diğer Antimikrobiyellere Duyarlılıkları

	VRE <i>E.faecium</i>			VRE <i>E.faecalis</i>
	Gaita (n= 11)	İdrar (n= 18)	Toplam (n= 29)	İdrar (n= 1)
	R Sayı (%)	R Sayı (%)	R Sayı (%)	R Sayı
Ampisilin	11 (100)	18 (100)	100	1
Penisilin	11 (100)	18 (100)	100	1
Gentamisin ^{YD}	3 (27.3)	5 (27.7)	8 (27.6)	0
Streptomisin ^{YD}	8 (72.7)	10 (55.5)	18 (62.1)	1
Siprofloksasin	8 (72.7)	17 (94.4)	25 (86.2)	1
Linezolid	0	0	0	0

R: Dirençli, YD: Yüksek düzey.

Fenotipik olarak hemolizin (sitolizin) pozitif olanlarda *cylL₅* geni pozitifliği *E.faecalis* ve *E.faecium* için sırasıyla %74.1, %11.1, *cylL_L* geni pozitifliği ise *E.faecalis* için %29.3 olarak saptanırken, *E.faecium* izolatlarında pozitif bulunmamıştır.

Fenotipik olarak hemolizin (sitolizin) negatif olan izolatlarda *cyl* genleri de (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL_L*, *cylL_S*) negatif bulunmuştur.

Çalışmamızda, *cylL_L* ve *cylL_S* geni pozitif *E.faecalis* izolatlarının bu genleri içermeyen izolatlara göre anlamlı düzeyde siprofloksasine daha dirençli oldukları saptanmıştır (sırasıyla, $p= 0.035$ ve $p= 0.017$). Aynı şekilde hemolizin pozitif *E.faecium* izolatlarında, hemolizin negatif olanlara göre vankomisin direncinin anlamlı düzeyde yüksek bulunduğu tespit edilmiştir ($p< 0.001$).

Vankomisin dirençli ve duyarlı izolatların virulans faktörleri karşılaştırıldığında; VRE *E.faecium* izolatlarında *esp* oranı %24.1 olarak bulunurken, *E.faecalis* izolatlarında *esp* geni bulunamamıştır. *Asa1* geni hem VRE *E.faecium* hem de VRE *E.faecalis* izolatlarında pozitif bulunamamıştır. *E.faecalis* izolatlarının %42.3'ünde, *E.faecium* izolatlarının

Tablo V. Örneklere ve Enterokok Türlerine Göre Virülans Faktörlerinin Dağılımı

Virülans faktörü	İdrar (n= 149)		Kan (n= 38)		Yara (n= 17)		Gaita (n= 13)		Diğer (n= 12)		Toplam (n= 229)		
	E-fl (n= 95) n (%)	E-fm (n= 54) n (%)	E-fl (n= 25) n (%)	E-fm (n= 13) n (%)	E-fl (n= 8) n (%)	E-fm (n= 9) n (%)	E-fl (n= 1) n (%)	E-fm (n= 12) n (%)	E-fl (n= 9) n (%)	E-fm (n= 3) n (%)	E-fl (n= 138) n (%)	E-fm (n= 91) n (%)	Toplam (n= 229) n (%)
<i>asa1</i>	51 (53.7)	9 (16.6)	16 (64)	7 (53.8)	6 (75)	7 (77.7)	0	0	7 (53.8)	0	80 (58)	23 (25.3)	103 (45)
<i>Esp</i>	37 (38.9)	20 (37)	5 (20)	0	4 (50)	8 (88.8)	0	0	0	0	46 (33.3)	28 (30.8)	74 (32.3)
<i>GelE</i>	9 (9.5)	0	2 (8)	0	2 (25)	1 (11.1)	0	0	4 (44.4)	0	17 (12.3)	1 (1.1)	18 (7.9)
<i>CylM</i>	2 (2.1)	2 (3.7)	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.4)	2 (2.2)	4 (1.7)
<i>CylB</i>	2 (2.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1.4)	0	2 (0.9)
<i>CylA</i>	9 (9.5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9 (6.5)	0	9 (3.9)
<i>CylL₁</i>	18 (18.9)	0	5 (18.5)	0	3 (37.5)	0	0	0	0	0	26 (18.8)	0	26 (11.4)
<i>CylL₅</i>	44 (46.3)	2 (3.7)	14 (51.9)	7 (53.8)	6 (75)	0	0	0	3 (33.3)	0	67 (48.6)	9 (9.9)	76 (33.2)
Jelatinaz aktivitesi	49 (52.7)	13 (23.6)	17 (63)	3 (23.1)	4 (50)	1 (11.1)	0	1 (8.3)	4 (44.4)	1 (33.3)	74 (53.6)	19 (20.9)	93 (40.6)
Hemolizin üretimi	39 (41.1)	19 (34.5)	11 (40.8)	3 (23.1)	7 (87.5)	0	0	6 (50)	2 (22.2)	1 (33.3)	59 (42.8)	29 (31.9)	88 (38.4)
<i>Esp + asa1</i>	13 (13.7)	4 (7.4)	2 (8)	0	3 (37.5)	3 (33.3)	0	0	0	0	18 (13)	7 (7.7)	25 (10.9)
<i>Esp + gelE</i>	2 (2.1)	0	0	0	1 (12.5)	0	0	0	0	0	3 (2.2)	0	3 (1.4)
Hemolizin + <i>asa1</i>	18 (18.9)	0	5 (20)	3 (23.1)	6 (75)	0	0	0	4 (44.4)	0	33 (23.9)	3 (3.3)	36 (15.7)
Jelatinaz + <i>asa1</i>	24 (25.3)	5 (9.3)	10 (40)	3 (23.1)	4 (50)	1 (11.1)	0	0	4 (44.4)	0	42 (30.4)	9 (9.9)	51 (22.3)

E-fl: *E.faecalis*, E-fm: *E.faecium*.

%19.3'ünde hemolizin aktivitesi pozitif bulunmuştur. VSE izolatlarında ise *esp* gen varlığı *E.faecalis* izolatlarının %35.1'inde, *E.faecium* izolatlarının %29.4'ünde, *asa1* gen varlığı *E.faecalis* izolatlarının %60.8'inde, *E.faecium* izolatlarının %47.1'inde, hemolizin aktivitesi *E.faecalis* izolatlarının %52.8'inde, *E.faecium* izolatlarının %23.5'inde tespit edilmiştir.

İzolatların antibiyotiklere direnç durumları ile içerdikleri virulans faktörleri arasındaki istatistiksel ilişki, *E.faecalis* için Tablo VI, *E.faecium* için ise Tablo VII'de sunulmuştur.

TARTIŞMA

Enterokoklar son zamanlarda toplum kökenli ve nozokomiyal enfeksiyonlarda izolasyon oranlarının artması ve glikopeptitler de dahil olmak üzere birçok antibiyotige karşı direnç geliştirmiş olmaları nedeniyle önemli hale gelmiştir¹⁷. Enterokoklar Amerika Birleşik Devletleri'nde hastanelerde, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, kan, idrar yolu ve kateter ilişkili enfeksiyonlarda ikinci en yaygın organizmalardır².

Enterokoklar arasında, *E.faecalis* enfeksiyonların en sık nedenidir, fakat *E.faecium* ABD'de nozokomiyal izolatların yarısından fazlasında ampisilin, vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozitlere daha dirençlidir¹⁸.

Çalışmaya alınan 229 enterokok izolatının 138 (%60.3)'i *E.faecalis*, 91 (%39.7)'i *E.faecium'dur*. Ampisilin, penisilin ve vankomisine *E.faecium* izolatlarının *E.faecalis* izolatlarına göre daha dirençli ($p= 0.001$, $p= 0.008$ ve $p< 0.001$) oldukları saptanmıştır. *E.faecium* izolatlarının, ampisilin (%76.9), penisilin (%80.2) ve vankomisinin (%31.9) yanı sıra yüksek düzey gentamisin (%40.7) ve yüksek düzey streptomisine (%63.7) değişik oranlarda dirençli oldukları saptanmıştır. Çalışmamızda *E.faecalis* izolatlarında YDG ve YDS direnci %47.1 ve %55.8 olarak belirlenmiştir. Hem YDG hem de YDS direnci gösteren izolatların oranı, *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatları için sırasıyla %38.5 (35/91) ve %41.3 (57/138) olarak saptanmıştır.

Benzer bir çalışmada, Baylan ve arkadaşları¹⁹ *E.faecium* izolatlarının ampisilin (%77.4), penisilin (%96.8), vankomisin (%25.8), yüksek düzey gentamisin (%74.2) ve yüksek düzey streptomisin (%61.3) direncini değişik oranlarda bulmuşlardır. Fernandes ve Dhanashree²⁰ çalışmalarında izolatların yaklaşık %50'sinde yüksek düzey aminoglikozit direnci (HLAR) pozitif bulmuşlardır. Toplam 13 (%8.6) izolatta vankomisin direnci belirlenmiştir. Schouten ve arkadaşları²¹ Avrupa ülkelerinde yüksek düzey gentamisin direncinin %1-48 (ortalama, 22.6 ± 12.3) arasında değişen prevalansı ile tespit edildiğini bildirmişlerdir. Li ve arkadaşları²² yaptıkları çalışmada YDG direncini %58.8, YDS direncini %50 ve her iki antibiyotik için direnci %34.4 olarak tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, vankomisin dirençli izolatlar idrar ve gaita örneklerinden 29'u *E.faecium*, biri *E.faecalis* olarak izole edilmiştir. Vankomisin dirençli *E.faecium* izolatlarının tamamı ampisilin ve penisiline dirençli bulunmuştur. Sekiz (%27.6) izolat YDG, 18 (%62.1) izolat YDS, 25 (%86.2) izolat siprofloksasine dirençli, hepsi linezolide duyarlı bulunmuştur. Vankomisin dirençli bir *E.faecalis* izolatının YDG'ye ve linezolide duyarlı olduğu, penisilin G, ampisilin, YDS ve siprofloksasine dirençli olduğu saptanmıştır.

Tablo VI. <i>E.faecalis</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Durumları ve Virulans Faktörlerinin ilişkisi (n= 138)											
	n	esp	asa1	gelE	cylM	cylB	cylA	cylL_L	cylL_S	J	H
Ampisilin											
S + I	62	24	40	9	1	1	4	14	28	38	29
R	76	32	42	2	0	0	5	11	40	35	29
T	138	56	82	11	1	1	9	25	68	73	58
P		0.472	0.450	0.197*	0.484*	0.484*	1.000*	0.341	0.461	0.105	0.243
Penisilin G											
S + I	51	24	32	9	2	2	3	12	23	27	23
R	87	24	50	4	0	0	6	13	44	46	35
T	138	48	82	13	2	2	9	25	67	73	58
P		0.099	0.630	0.092	0.196	0.196	0.822	0.375	0.689	0.906	0.476
Vankomisin											
S + I	137	48	83	12	2	2	9	25	67	72	58
R	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	138	48	83	12	2	2	9	25	67	72	58
P		0.463	0.400*	1.000*	1.000*	1.000*	1.000*	1.000*	1.000*	0.472	1.000*
Gentamisin^{YD}											
S + I	73	35	38	10	0	0	6	10	29	40	31
R	65	14	44	2	1	1	3	15	39	33	27
T	138	49	82	12	1	1	9	25	68	73	58
P		0.019 ^S	0.187	0.203	0.452	0.452	0.686	0.211	0.051	0.688	0.912
Streptomisin^{YD}											
S + I	61	32	31	6	0	0	3	8	24	30	26
R	77	17	51	6	1	1	3	17	44	43	32
T	138	49	82	12	1	1	6	25	66	73	58
P		0.010 ^S	0.213	1.000*	1.000*	1.000*	0.680	0.272	0.075	0.459	0.900
Siprofloksasin											
S + I	46	22	24	5	0	0	0	2	13	21	17
R	92	29	57	7	1	1	6	22	51	51	40
T	138	51	81	12	1	1	6	24	64	72	57
P		0.222	0.448	0.635	1.000*	1.000*	0.186	0.035 ^R	0.017 ^R	0.432	0.447
Linezolid											
S + I	137	47	82	12	1	1	9	25	66	73	58
R	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	138	47	82	12	1	1	9	25	66	73	58
P		0.463	0.400	1.000*	1.000*	1.000*	1.000*	1.000*	1.000*	0.472	1.000*

* Fisher's exact test.
S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli; T: Toplam; n: İzolat sayısı; esp: Enterokok yüzey proteinini kodlayan gen; asa1: Agregasyon faktörünü kodlayan gen; gelE: Jelatinazı kodlayan gen; cyl: Sitolizini kodlayan gen; J: Jelatinaz; H: Hemolizini; NA: Uygulanamadı; D= Duyarlı; R= Dirençli.

Tablo VII. E.faecium İzolatlarının Antibiyotik Direnç Durumları ve Virulans Faktörlerinin İlişkisi (n= 91)											
	n	esp	asa1	gelE	cylM	cylB	cylA	cylL _L	cylL _S	J	H
Ampisilin											
S + I	21	6	12	0	0	0	0	0	4	6	5
R	70	18	7	0	2	0	0	0	4	14	26
T	91	24	19	0	2	0	0	0	8	20	31
P		1.000*	0.012* ^S	NA	1.000*	NA	NA	NA	0.349*	0.503*	0.246
Penisilin G											
S + I	18	0	5	0	0	0	0	0	4	3	2
R	73	21	12	0	2	0	0	0	4	20	27
T	91	21	17	0	2	0	0	0	8	23	29
P		0.560*	0.548*	NA	1.000*	NA	NA	NA	0.298*	0.471*	0.066
Vankomisin											
S + I	62	18	29	0	0	0	0	0	11	15	12
R	29	7	0	0	1	0	0	0	0	0	18
T	91	25	29	0	1	0	0	0	11	15	30
P		0.737*	< 0.001 ^S	NA	1.000*	NA	NA	NA	0.045* ^S	NA	< 0.001 ^R
Gentamisin^{YD}											
S + I	54	13	7	0	0	0	0	0	5	14	19
R	37	12	9	0	2	0	0	0	0	8	11
T	91	25	16	0	2	0	0	0	5	22	30
P		0.726*	0.443*	NA	0.333*	NA	NA	NA	0.543*	0.669	0.598
Streptomisin^{YD}											
S + I	33	8	4	0	2	0	0	0	2	7	13
R	58	16	12	0	0	0	0	0	4	15	18
T	91	24	16	0	2	0	0	0	6	22	31
P		1.000*	0.691*	NA	0.417*	NA	NA	NA	1.000*	1.000*	0.463
Siprofloksasin											
S + I	21	4	4	0	0	0	0	0	0	2	4
R	70	19	12	0	2	0	0	0	5	19	25
T	91	23	16	0	2	0	0	0	5	21	29
P		1.000*	1.000*	NA	1.000*	NA	NA	NA	1.000*	0.417*	0.366*
Linezolid											
S + I	89	22	14	0	0	0	0	0	0	20	31
R	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0
T	91	24	16	0	0	0	0	0	0	21	31
P		0.261*	0.174*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.419*	0.548*

* Fisher's exact test.
S: Duyarlı; I: Orta duyarlı; R: Dirençli; T: Toplam; n: İzolat sayısı; esp: Enterokok yüzey proteinini kodlayan gen;
asa1: Agregasyon faktörünü kodlayan gen; gelE: Jelatinazı kodlayan gen; cyl: Sitolizini kodlayan gen; J: Jelatinaz;
H: Hemolizin; NA: Uygulanamadı; D= Duyarlı; R= Dirençli.

E.faecalis ve *E.faecium* izolatlarında *esp*, *asa1*, *gelE* ve *cyl* içeren birçok virulans faktörü genleri tarif edilmiş, insan ve hayvan çalışmalarında etkileri gösterilmiştir.

Konağın bağışıklık sisteminden bakteriyi koruduğu düşünülen *esp*'nin üriner sistemde kolonizasyonu artırarak persistansa neden olduğu bilinmektedir. *Esp* biyofilm oluşumu ile ilişkilidir. *E.faecalis* izolatlarında daha yaygın olmasına rağmen, hastane kökenli *E.faecium* izolatlarında daha sık görülür. *Esp* geni bakteremi ve endokardite neden olan izolatlarda daha yüksek bulunurken gaita örneklerinde daha düşük miktarda bulunur¹. Bizim çalışmamızda gaita izolatlarında *esp* geni tespit edilmemiştir.

Li ve arkadaşları²¹ Çin'de yaptıkları çalışmada 160 enterokok türünde virulans geni olarak en sık *esp* (%50.6) izole etmişlerdir. Al-Talib ve arkadaşları²³ Malezya'da yaptıkları çalışmada 222 enterokok izolatında *esp* genini araştırmışlar ve tüm izolatlarda %45.5, VRE izolatlarında %85.7, VSE izolatlarında %44.2 pozitiflik tespit etmişlerdir. Biswas ve arkadaşları²⁴ Hindistan'da yaptıkları çalışmalarında klinik izolatlarda *esp* genini VRE'de %27.8 ve VSE'de %8.9 olarak bulmuşlardır. Van Kerckhoven ve arkadaşları²⁵ 8 farklı Avrupa ülkesindeki merkezlerden elde ettikleri VRE *E.faecium* izolatlarının %65'inde *esp* genini tespit etmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada Baylan ve arkadaşları¹⁸ *esp* genini tüm izolatlarda %25.6, VSE *E.faecium* izolatlarında %8.7, VSE *E.faecalis* izolatlarında %35.6 pozitif olarak bulmuşlardır. VRE *E.faecium* ve VRE *E.faecalis*'te pozitiflik saptayamamışlardır.

Çopur ve arkadaşları²⁶ ise *esp* genini tüm izolatlarda %78.4 olarak, VRE *E.faecium* izolatlarında %79.8 ve VRE *E.faecalis* için %100, VSE *E.faecium* için %75 ve VSE *E.faecalis* için %68.4 olarak bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda *esp* geni %32.3 olarak saptanmıştır. VRE izolatlarında *esp* gen varlığı *E.faecium* için %24.1 olarak bulunurken, *E.faecalis* izolatlarında *esp* geni bulunmamıştır. VSE izolatlarında ise, *esp* geni *E.faecalis* için %35.1, *E.faecium* için %29.4 olarak bulunmuştur. Benzer şekilde, bazı Avrupa ülkelerinde VSE izolatlarında VRE izolatlarına göre daha yüksek *esp* bildirilmiştir²⁵.

Creti ve arkadaşları²⁷ invaziv *E.faecalis* izolatlarında *esp* genini %38.4, invaziv olmayan örneklerde ise %56.2 olarak bulmuşlardır. Strateva ve arkadaşları²⁸ bakteremi ile seyreden klinik örneklerden izole edilen *E.faecalis* izolatlarında *esp* genini %33.3, invaziv olmayan örneklerde ise %54.3 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda kan örneklerinden izole edilen invaziv *E.faecalis* izolatlarında *esp* geni %20, invaziv olmayan örneklerde %36.3 olarak bulunmuştur. Ayrıca gaita örneklerinde *esp* ve diğer virulans genleri bulunmamıştır.

Asa1 virulans geni sistemik enfeksiyonların gelişmesini kolaylaştıran bakterilerin ökar-yot yüzeylere bağlanmasına izin veren bir virulans faktörüdür¹. Baylan ve arkadaşları¹⁸'nin çalışmasında *asa1* gen pozitifliği *E.faecium* izolatlarında saptanmazken, *E.faecalis* izolatlarında %40.7 olarak bulunmuştur. Sharifi ve arkadaşları²⁹ *E.faecalis* izolatlarında *asa1* genini %69.6, *E.faecium* izolatlarında %8 olarak bulmuşlardır. Hallgren ve arkadaşları¹⁴ *E.faecalis* izolatlarında *asa1* genini %79 olarak bulmuşlar, *E.faecium* izolatlarında pozitiflik

bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda *asa1* geni *E.faecalis* izolatlarında %58, *E.faecium* izolatlarında %25.3 olarak bulunmuştur. İstatistiksel analizde, *E.faecalis* izolatlarında *E.faecium* izolatlarına göre *asa1* geni anlamlı düzeyde yüksektir ($p < 0.001$).

Zou ve arkadaşları³⁰ *gelE* genini en yaygın virulans geni olarak bulurken, Çopur ve arkadaşları²⁵ *gelE* genini %12.9 olarak tespit etmişlerdir. Van Kerckhoven ve arkadaşları²³ ise *gelE* genini tespit etmemişlerdir. Bizim çalışmamızda *gelE* geni %7.9 olarak bulunmuştur.

Baylan ve arkadaşları¹⁸ jelatinaz üretimini *E.faecalis* izolatlarında %22 ve *E.faecium*'da %3.2 olarak bulmuşlardır. Al-Talib ve arkadaşları²² çalıştıkları 222 enterokok izolatında jelatinaz üretimini *E.faecalis* izolatlarında %76.5 ve *E.faecium*'da %66.7 olarak bulmuşlardır. Coque ve arkadaşları³¹ jelatinaz üretimini endokardit örneklerinden izole edilen *E.faecalis* izolatlarında %54, diğer kan kültür izolatlarında %68 olarak bulmuşlardır. Fernandes ve Dhanashree¹⁹ çalışmalarında jelatinaz aktivitesini %40.6 oranında pozitif bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda jelatinaz üretimi %40.6, kan örneklerinden izole edilen *E.faecalis* izolatlarında %63, *E.faecium* izolatlarında %23.1 olarak bulunmuştur. İstatistiksel analizde, *E.faecalis* izolatlarında *E.faecium* izolatlarına göre jelatinaz aktivitesi anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

Sitolizinler bağıışıklık hücreleri de dahil olmak üzere ökaryotik hücrelerde çeşitli türlerine karşı litik aktiviteye sahiptir. *E.faecalis* sitolizini ile ilgili birçok çalışma, bu molekülün insan ve model sistemlerde enfeksiyonu şiddetlendirdiğini göstermektedir⁵. Bizim çalışmamızda istatistiksel olarak, *E.faecalis* izolatlarında *E.faecium* izolatlarına göre *cylL*₅ ve *cylL*₅ gen pozitifliği anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (sırasıyla, $p = 0.002$ ve $p < 0.001$). *CylL*₅ *E.faecalis* için %48.9, *E.faecium* için 17.6, *cylLL* *E.faecalis* için %18.5, *E.faecium*'da negatif olarak bulunmuştur. Diğer sitolizinler daha düşük oranlarda bulunmuştur.

Fernandes ve Dhanashree¹⁹ çalışmalarında hemolizin üretimini 123 (%82) izolatta pozitif bulmuşlardır. Baylan ve arkadaşları¹⁸ hemolizin üretimini %11.1 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda fenotipik olarak izolatların %38.4'ünün hemolizin ürettiği belirlenmiştir. Fenotipik olarak hemolizin (sitolizin) pozitif olanlarda *cylL*₅ geni pozitifliği *E.faecalis* için %74.1, *E.faecium* için %11.1, *cylL*_L geni pozitifliği *E.faecalis* için %29.3 olarak bulunmuş, *E.faecium* izolatlarında pozitiflik tespit edilmemiştir.

Fenotipik olarak hemolizin (sitolizin) negatif olan izolatlarda *cyl* genleri de (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL*_L, *cylL*₅) negatif bulunmuştur.

Gaitadan izole edilen VRE izolatlarında virulans faktörü olarak sadece fenotipik olarak jelatinaz %8.3 ve hemolizin %50 oranında pozitif bulunmuş olup diğer virulans faktörleri (*asa1*, *esp*, *cyl* (*M*, *B*, *A*, *L*_L, *L*₅) ve *gelE*) pozitif bulunamamıştır. Bu bize enterokokların önce gastrointestinal sistemde kolonize olduğunu daha sonra virulans faktörleri kazanarak organ ve dokularda enfeksiyonların oluşmasında ve yayılmasında önemli olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda diğer önemli bir nokta, VSE izolatlarının VRE izolatlarından daha fazla virulans genine sahip olduğudur. VRE özellikle hastanede yatan hastalarda dirençten dolayı tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmakla birlikte, VSE'nin de önemli virulans faktörlerine sahip olması nedeniyle ciddi enfeksiyonlara sebep olabileceği akılda tutulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(6): 533-40.
2. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10(4): 266-78.
3. Clewell DB. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid* 2007; 58(3): 205-27.
4. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol* 1994; 176(23): 7335-44.
5. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins* 2013; 29(5): 895-911.
6. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009; 155(6): 1749-57.
7. Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2579-86.
8. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57(1): 138-63.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement, 2009. CLSI Document M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
10. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid* 1995; 34(2): 152-6.
11. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67(1): 193-200.
12. Mannu L, Paba A, Daga E, et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* 2003; 88(2-3): 291-304.
13. Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6): 2569-76.
14. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(4): 1628-35.
15. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol* 2009; 299(5): 323-32.
16. Macovei L, Ghosh A, Thomas VC, Hancock LE, Mahmood S, Zurek L. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environ Microbiol* 2009; 11(6): 1540-7.
17. Panesso D, Reyes J, Rincon S, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1562-9.
18. O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 2015; 24(8): 217-30.
19. Baylan O, Nazik H, Bektöre B, et al. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *Enterococcus* isolates. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 430-45.
20. Fernandes SC, Dhanashree B. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Med Res* 2013; 137(5): 981-5.
21. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JA. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. The European VRE Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(10): 2542-6.
22. Li W, Li J, Wei Q, et al. Characterization of aminoglycoside resistance and virulence genes among *Enterococcus* spp. isolated from a hospital in China. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(3): 3014-25.

23. Al-Talib H, Zuraina N, Kamarudin B, Yean CY. Genotypic variations of virulent genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from three hospitals in Malaysia. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24(1): 121-7.
24. Biswas PP, Dey S, Sen A, Adhikari L. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. *J Glob Infect Dis* 2016; 8(1): 16-24.
25. Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C, et al. 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* 2004; 42(10): 4473-9.
26. Çopur ŞŞ, Şahin F, Göçmen JS. Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin sensitive and resistant enterococci isolated from clinical samples. *Turk J Med Sci* 2016; 46(3): 877-91.
27. Creti R, Imperi M, Bertuccini L, et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol* 2004; 53(1): 13-20.
28. Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis* 2016; 20(2): 127-33.
29. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Adv Pharm Bull* 2013; 3(1): 197-201.
30. Zou LK, Wang HN, Zeng B, et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiol* 2011; 34(1): 73-80.
31. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* 1995; 171(5): 1223-9.