

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* İzolatlarının Antibiyotik Direnci ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması

Investigation of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Clinical Samples

Şerife Merve GÖK¹(ID), Hatice TÜRK DAĞI¹(ID), Fatih KARA²(ID), Uğur ARSLAN¹(ID), Duygu FINDIK¹(ID)

¹ Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

¹ Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

² Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Konya.

² Selçuk University Faculty of Medicine, Department of Public Health, Konya, Turkey

* Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje no. 15202011).

Makale Atfı: 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 2020;54(1):26-39.

ÖZ

Çevrede yaygın olarak bulunan enterokoklar iyi tanımlanmış virülans faktörleri ve toksinleri olmamasına rağmen ciddi enfeksiyonlara neden olur. Enterokokların virülans özelliklerinin bilinmesi, karmaşık patojenik yapılarını anlamak için önemlidir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* izolatlarının virülans faktörlerinin (*asa1*, *hyl*, *cylA*, *efa*, *ebp*, *ace*, *esp*, *gelE*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* genleri, jelatinaz aktivitesi, hemolizin, hidrojen peroksit ve biyofilm üretimi) ve antibiyotik direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen toplam 110 enterokok izolatı çalışmaya alınmıştır. İzolatların tür tanısı ve virülans genlerinin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır. İzolatların hemoliz özelliği, biyofilm yapımı, hidrojen peroksit üretimi ve jelatinaz aktivitesi fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi VITEK 2 otomatize sistemi ile yapılmıştır. Tüm testlerde kalite kontrol olarak *E.faecalis* ATCC 29212 standart suşu kullanılmıştır. Çalışmaya alınan 110 enterokok izolatının 61'i *E.faecium*, 49'u *E.faecalis* olarak tanımlanmıştır. *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatlarında en çok rastlanan virülans geni %92.7'lik oran ile *efa* geni olmuştur. Diğer genlerden *ace* %83.6, *esp* %66.4, *ebp* %60.0, *cyl* %50.9, *hyl* %46.4, *asa1* %45.5, *gelE*, *sprE* ve *fsrC* genleri %33.6, *fsrA* %12.7 ve *fsrB* %11.8 oranında saptanmıştır. *E.faecalis* izolatlarında *hyl* dışındaki tüm genler daha yüksek oranda saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). *E.faecalis* izolatlarının 25 (%51)'inin, *E.faecium* izolatlarının 1 (%1.6)'inin beta-hemoliz yaptığı saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.000$). Yedi (%11.5) *E.faecium* ve 4 (%8.2) *E.faecalis* izolatının biyofilm yaptığı saptanmış ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). İki (%3.3) *E.faecium* ve 14 (%28.6) *E.faecalis* izolatının jelatinaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiş ve iki tür arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Hatice Türk Dağı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 42131, Selçuklu, Konya, Türkiye. Tel (Phone): +90 505 253 36 38, E-posta (E-mail): haticeturkdagi@yahoo.com

tur ($p=0.000$). Çalışmaya alınan izolatların hiçbirinde hidrojen peroksit üretimi saptanmamıştır. En yüksek direnç oranı siprofloksasine (%70.9) karşı tespit edilmiştir. Ampisiline %69.1, tetrasikline %67.3, yüksek düzey streptomisine %65.1, yüksek düzey gentamisine %39.4, vankomisin ve teikoplanine %4.5, linezolidde %1.8 oranında direnç saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışmamızda biyofilm üretimi ve *hyl* geni hariç virülans faktörlerinin *E.faecalis* izolatlarında daha yüksek oranda bulunduğu ancak *E.faecium* türlerinin antibiyotiklere daha dirençli olduğu saptanmıştır. Hastane ortamında bu tür virülansı yüksek veya dirençli izolatların enfeksiyonunu önlemek için, enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulması gerekmektedir. Enterokokların virülansının daha iyi anlaşılması için in vivo çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; virülans faktörleri.

ABSTRACT

Enterococci, which are commonly found in the environment, cause serious infections despite the absence of well-defined virulence factors and toxins. Knowing the virulence properties of enterococci is important to understand the complex pathogenic structures. In this study, we aimed to investigate the virulence factors (*asa1*, *hyl*, *cylA*, *efa*, *ebp*, *ace*, *esp*, *gelE*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* genes, gelatinase activity, hemolysin, hydrogen peroxide and biofilm production) and antibiotic resistance of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical specimens. A total of 110 enterococcus isolates which were accepted as infectious agents were included in the study. The polymerase chain reaction method was used to identify the isolates and to detect virulence genes. Characteristics of hemolysis, biofilm formation, hydrogen peroxide production and gelatinase activity were investigated by phenotypic methods. The antibiotic susceptibility test was performed with VITEK 2 automated system. *E.faecalis* ATCC 29212 standard strain was used as a quality control in all tests. Of the 110 enterococci isolates included in the study, 61 were identified as *E.faecium* and 49 as *E.faecalis*. The *efa* gene was the most frequently detected virulence gene (92.7%), followed by *ace* (83.6%), *esp* (66.4%), *ebp* (60.0%), *cylA* (50.9%), *hyl* (46.4%), *asa1* (45.5%), *gelE*, *sprE*, *fsrC* (33.6%), *fsrA* (12.7%) and *fsrB* (11.8%). All genes except *hyl* were higher in *E.faecalis* isolates and the difference was statistically significant ($p<0.05$). Twenty-five (51%) *E.faecalis* and 1 (1.6%) *E.faecium* isolates had beta-hemolysis and the difference was statistically significant ($p=0.000$). Seven (11.5%) *E.faecium* and 4 (8.2%) *E.faecalis* isolates formed biofilm, but the difference was not statistically significant ($p>0.05$). Two (3.3%) *E.faecium* and 14 (28.6%) *E.faecalis* isolates exhibited gelatinase activity and the difference between the two species was statistically significant ($p=0.000$). Hydrogen peroxide production was not detected in any of the isolates. The highest resistance rate was determined against ciprofloxacin (70.9%). The resistance to ampicillin was 69.1%, high level streptomycin 65.1%, high level gentamicin 39.4%, vancomycin and teicoplanin 4.5%, and linezolid 1.8%. In conclusion, our data indicated that virulence factors except *hyl* gene and biofilm production were higher in *E.faecalis* isolates but *E.faecium* isolates were more resistant to antibiotics. In order to prevent infection of such virulent or resistant isolates in the hospital setting, infection control measures must be followed. In vivo studies are needed for the better understanding of the virulence of enterococci.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; virulence factors.

GİRİŞ

Enterokoklar insan ve hayvanların gastrointestinal sistem florası üyeleridir. Doğada yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeniyle gerek hastanede gerekse toplumda endojen kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. Pek çok türü olmasına karşın insan enfeksiyonlarından sıklıkla *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izole edilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, endokardit ve bakteriyemi etkenidirler. *E.faecalis* klinik örneklerden en sık izole edilen ve insan enfeksiyonlarında en sık görülen türdür. Son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli bir etkeni olan *E.faecium*, *E.faecalis*'e göre antimikrobiyal ajanlara daha dirençlidir^{1,2}.

Enterokoklar klindamisin, penisilin, aminoglikozitler ve sefalosporinler dahil birçok antibiyotiğe karşı intrensek dirençli olmalarının yanı sıra diğer antibiyotiklere de kolaylıkla direnç geliştirebilir. *E.faecium* izolatlarının neredeyse tümü ampisiline dirençlidir ve günümüzde vankomisine de direnç kazanmaktadır. Ampisiline ve vankomisine dirençli enterokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için linezolid ve florokinolonlar gibi yeni antibiyotikler geliştirilmiştir. Maalesef linezolide direnç artmakta ve florokinolonlar vankomisine dirençli enterokok izolatlarına karşı zayıf etki göstermektedir^{2,3}.

Fırsatçı patojen olan enterokokların klinikte artan önemine rağmen, virülansları günümüzde hala iyi anlaşılabilmiş değildir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda enterokoklar biyofilm oluşumu, jelatinaz üretimi, hemolizin, hiyaluronidaz, enterokok yüzey proteini ve agregasyon faktörü gibi virülans faktörleri ile ilişkilendirilmiştir. Enterokoklara özgü virülans faktörlerin büyük çoğunluğu plazmitler üzerinde kodlanır ve gastrointestinal sistem gibi doğal çevrede bulunan izolatlar arasında horizontal olarak hızla yayılmayı sağlar^{4,5}.

Literatür taraması yapıldığında ülkemizde enterokoklarda virülans faktörlerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunduğu ve virülans faktörlerinin birçoğunun (biyofilm oluşumu, *ebp*, *efa*, *ace*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB* ve *fsrC*) araştırılmadığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının ve virülans faktörlerinin (*asa1*, *hyl*, *cyIA*, *efa*, *ebp*, *ace*, *esp*, *gelE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *sprE* genleri, jelatinaz aktivitesi, hemolizin varlığı, hidrojen peroksit ve biyofilm üretimi) araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 04.11.2014 ve Karar no: 2014/284).

Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2013-2015 yıllarında yatan hastaların klinik örneklerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 110 enterokok izolatı çalışmaya alındı. Klinik örnekler, %5 koyun kanlı Columbia agara (bioMerieux, Fransa) ekildi ve plaklar 37°C'de bir gece inkübe edildi. Üreyen bakteriler *gelE*-neksel yöntemlerle [Gram boyama, katalaz testi, eskülin hidrolizi, %6.5'lik NaCl içeren besiyerinde üreme ve PYR testi (L-pirolidonil-β-naftilamid)] ve VITEK 2 otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) ile tanımlandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların ampisilin, eritromisin, siprofloksasin, tetrasiklin, vankomisin, teikoplanin ve linezolide karşı duyarlılık testleri VITEK 2 otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) ile yapıldı ve "Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)" standartlarına göre değerlendirildi. Yüksek düzey gentamisin (YDG) direnci 500 µg/ml, yüksek düzey streptomisin

(YDS) direnci 1000 µg/ml düzeyinde VITEK 2 otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) ile tarandı. Üreme olması halinde bakteri dirençli kabul edildi⁶.

Fenotipik Testler

Hemolizin varlığının araştırılması için izolatlar %5 koyun kanlı agara (bioMerieux, Fransa) ekildi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Kolonilerin etrafında şeffaf bir zon oluşması beta-hemoliz (hemolizin üretimi) olarak değerlendirildi. Jelatinaz üretimi için %5 koyun kanlı agarda (bioMerieux, Fransa) üremiş bakteri bir öze ile alınarak %1.5 "skim milk" ile zenginleştirilmiş triptik soy agara (Oxoid, İngiltere) çizgi şeklinde ekildi. Besiyeri 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerin etrafında berrak bir halo görülmesi pozitif olarak değerlendirildi⁷.

Biyofilm Üretiminin Araştırılması

Biyofilm üretiminin araştırılması için izolatların Luria Broth (LB) besiyerinde (Merck, Almanya) üç gün arka arkaya pasajları yapıldı. Üçüncü pasajı yapılan örneklerin absorbans spektrofotometrede (S-22 UV/Vis. Cihazı BOECO-Almanya) 540 nm'de 0.56-0.64 olacak şekilde ayarlandı. Absorbans ayarlanan örneklerden 200 µl 96 kuyucuklu mikrop-lağa aktarıldı ve kontrol kuyucuğuna sadece LB besiyeri kondu. Mikroplak 25°C'de 24 saat inkübe edildi. Her kuyucuğa 25 µl kristal viyole eklendi. Mikroplak çalkalandıktan sonra 15 dakika bekletildi. Kuyucuklardaki besiyeri çıkarılıp otomatik yıkama cihazında (BİOTEK-ABD ELx 50) fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile üç kere yıkandı. Her bir kuyucuğa 200 µl %96'lık etanol eklendi. 590 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü (BİOTEK-ABD ELx800). Bakteri içeren kuyucuklardan elde edilen absorbans değerlerinden kontrol kuyucuğundan elde edilen değer çıkarıldı. Sonuç 0.1'in üstünde ise pozitif, 0.1'in altında ise negatif olarak kabul edildi⁸.

Hidrojen peroksit testi üretici firmanın (Quantofix Peroxide, Almanya) önerilerine göre yapıldı. 3 ml beyin kalp infüzyon buyyon içeren tüplere birkaç koloni bakteri konuldu. Hidrojen peroksit test çubuğu, buyyonların içerisine daldırılıp 1-2 saniye sonra çıkartıldı. On-on beş saniye içinde test çubuğunda mavi renk oluşması beklenildi. Oluşan renk tonu kit içeriğindeki renk skalasıyla karşılaştırılarak hidrojen peroksit miktarı belirlendi.

DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA izolasyonu Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak yapıldı. İzolatların tür tanısının doğrulanması ve *ebp*, *asa1*, *esp*, *gelE*, *cylA*, *hyl*, *efa*, *ace*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* ve *sprE* virülans genlerinin saptanması için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanıldı (Tablo I).

İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatlarında antibiyotik direnci ve virülans faktörlerinin dağılımı ki-kare ve Fisher kesin testi ile karşılaştırıldı ve p< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo I. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* izolatlarının Tanımlanması ve Virülans Genlerinin Saptanması İçin Kullanılan Primerler

Hedef gen	Primer Dizisi (5'-3')	Baz çifti	Kaynak
<i>E.faecalis</i>	<i>ddlE</i> -1: ATC AAG TAC AGT TAG TCT TTA TTA G <i>ddlE</i> -2: ACG ATT CAA AGC TAA CTG AAT CAG T	941	Kafil ve ark ⁹ (2013)
<i>E.faecium</i>	<i>ddlF</i> -1: TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG <i>ddlF</i> -2: TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC	658	Kafil ve ark ⁹ (2013)
<i>asa1</i>	<i>asa</i> -1: GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA <i>asa</i> -2: TAA GAA AGA ACA TCA CCA CGA	375	Vankerckhoven ve ark ¹⁰ (2004)
<i>gelE</i>	<i>gelE</i> -F: TAT GAC AAT GCT TTT TGG GAT <i>gelE</i> -R: AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA	213	Vankerckhoven ve ark ¹⁰ (2004)
<i>esp</i>	<i>esp</i> -F: AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G <i>esp</i> -R: AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG	510	Vankerckhoven ve ark ¹⁰ (2004)
<i>cylA</i>	<i>cyl</i> -F: ACT CGG GGA TTG ATA GGC <i>cyl</i> -R: GCT GCT AAA GCT GCG CTT	688	Vankerckhoven ve ark ¹⁰ (2004)
<i>hyl</i>	<i>hyl</i> -F: ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG <i>hyl</i> -R: GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA	276	Vankerckhoven ve ark ¹⁰ (2004)
<i>ebp</i>	<i>ebp</i> -A: AAA AAT GAT TCG GCT CCA GAA <i>ebp</i> -B: TGC CAG ATT CGC TCT CAA AG	101	Kafil ve ark ⁹ (2013)
<i>ace</i>	<i>ace</i> -F: GGA GAG TCA AAT CAA GTA CGT TGG TT <i>ace</i> -R: TGT TGA CCA CTT CCT TGT CGA T	101	Kafil ve ark ⁹ (2013)
<i>efa</i>	<i>efa</i> -F: TGG GAC AGA CCC TCA CGA ATA <i>efa</i> -R: CGC CTG TTT CTA AGT TCA AGC C	101	Kafil ve ark ⁹ (2013)
<i>fsrA</i>	<i>fsrA</i> -F: GGG AGC TCT GAT GAT GAT TGA TTG ATG GAC <i>fsrA</i> -R: GGG GTA CCA TTA CAA GTG GCA CAC CAG GAC	484	Qin ve ark ¹¹ (2000)
<i>fsrB</i>	<i>fsrB</i> -F: GGG AGC TCT GGA CAA AGT ATT ATC TAA CCG <i>fsrB</i> -R: TTG GTA CCC ACA CCA TCA CTG ACT TTT GC	574	Qin ve ark ¹¹ (2000)
<i>fsrC</i>	<i>fsrC</i> -F: GGG AGC TCA TCG TGT GTT AGA AAA TAG C <i>fsrC</i> -R: GGG GTA CCA CGA ATC ACA ACC ACT AAG TC	580	Qin ve ark ¹¹ (2000)
<i>sprE</i>	<i>sprE</i> -F: CTT GTC TGC AAA TGC AGA AG <i>sprE</i> -R: CGC CAT TGG AAT GAA CAC CA	660	Lindenstraub ve ark ¹² (2011)

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 110 *Enterococcus* spp. izolatının 61'i *E.faecium*, 49'u *E.faecalis* olarak tanımlanmıştır. *E.faecium* ve *E.faecalis* izolatlarının örneklerle göre dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir. Üreyen tür ile klinik örnek arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

E.faecium ve *E.faecalis* izolatlarında en yüksek direnç oranı siprofloksasine (%70.9) karşı tespit edilmiştir. Ampisiline %69.1, tetrasikline %67.3, YDS'ye %65.1, YDG'ye %39.4,

Tablo II. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* İzolatlarının Örneklerle Göre Dağılımı

	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecalis</i>		Toplam	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
İdrar	43	70.5	38	77.6	81	73.6
Kan	15	24.6	7	14.3	22	20.0
Yara/Apse	3	4.9	4	8.2	7	6.4
Toplam	61	55.5	49	44.5	110	100

vankomisin ve teikoplanine %4.5, linezolide %1.8 oranında direnç saptanmıştır. Antibiyotiklere direnç oranlarının *E.faecium* izolatlarında *E.faecalis* izolatlarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Aradaki fark ampisilin, siprofloksasin, tetrasiklin ve YDS için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, diğer antibiyotikler için anlamlı bulunmamıştır (Tablo III).

Enterokok izolatlarının hemoliz özelliği değerlendirildiğinde; 49 *E.faecalis* izolatının 25 (%51)'inin, 61 *E.faecium* izolatının 1 (%1.6)'inin beta-hemoliz yaptığı saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.000$) (Resim 1).

E.faecium izolatlarının 7 (%11.5)'sinin ve *E.faecalis* izolatlarının 4 (%8.2)'ünün biyofilm yaptığı saptanmış ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.752$) (Resim 2).

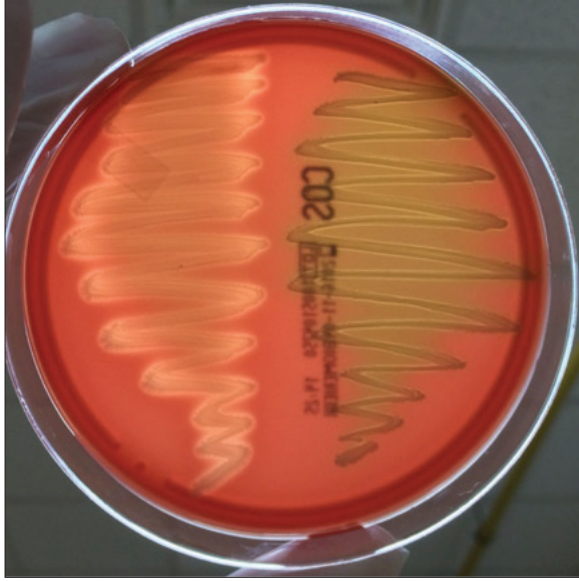
On dört (%28.6) *E.faecalis* ve 2 (%3.3) *E.faecium* izolatının jelatinaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.000$) (Resim 3).

Çalışmaya alınan enterokok izolatlarının hiçbirinde hidrojen peroksit üretimi saptanmamıştır (Resim 4). Klinik örneklerle hemolizin varlığı, jelatinaz aktivitesi ve biyofilm üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p> 0.05$).

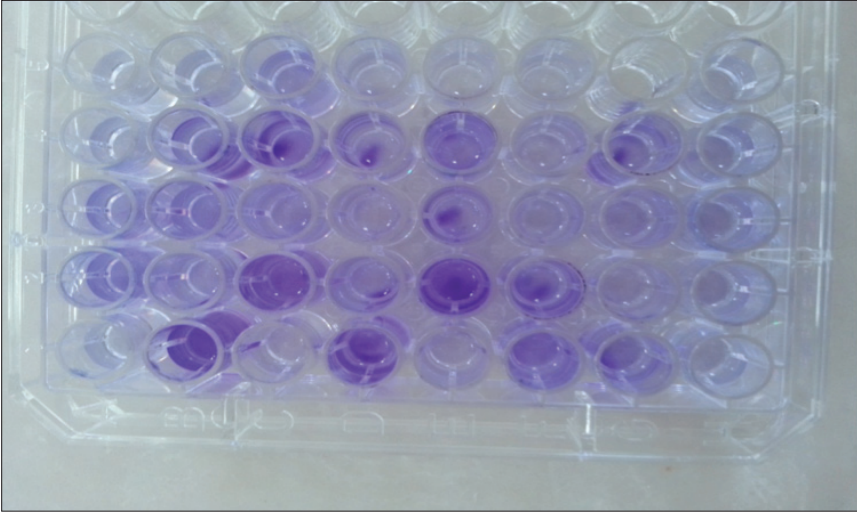
Tablo III. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotik	<i>E.faecium</i> (n= 61)		<i>E.faecalis</i> (n= 49)		p	Toplam (n= 110)	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		Sayı	Yüzde
Siprofloksasin	56	91.8	22	44.9	0.000	78	70.9
Ampisilin	57	93.4	19	38.8	0.000	76	69.1
Tetrasiklin	33	54.1	41	83.7	0.001	74	67.3
YDS	45	73.8	26	54.2	0.043	71	65.1
YDG	23	37.7	20	41.7	0.697	43	39.4
Vankomisin	5	8.2	0	0	0.064	5	4.5
Teikoplanin	5	8.2	0	0	0.064	5	4.5
Linezolid	2	3.3	0	0	0.728	2	1.8

YDS: Yüksek düzey streptomisin, YDG: Yüksek düzey gentamisin.

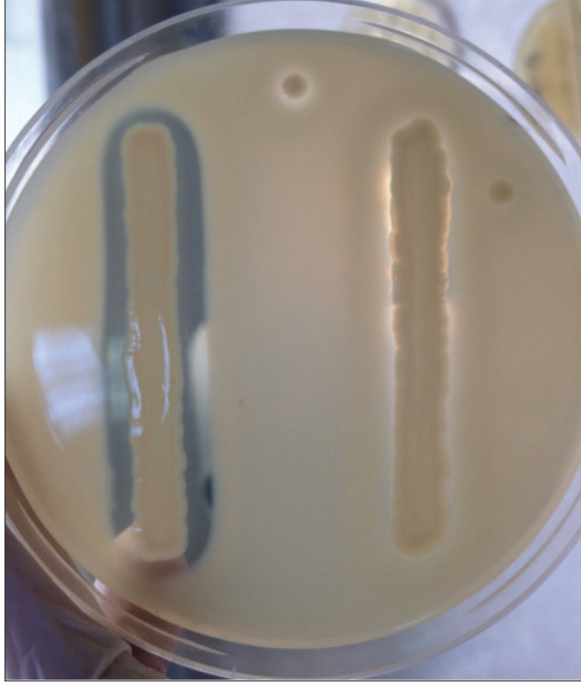


Resim 1. Beta (sol) ve alfa (sağ) hemoliz yapan *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatları.

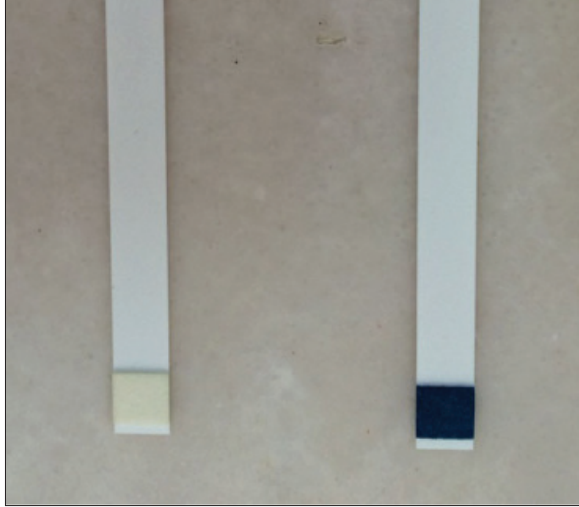


Resim 2. Mikroplak yöntemi ile biyofilm üretimi saptanması.

Virülans genleri arasında *efa* (%92.7) ve *ace* (%83.6) en sık saptanan genler olmuştur. *hyl* dışındaki tüm genler *E.faecalis* izolatlarında daha yüksek oranda saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). *hyl* geni ise *E.faecium* izolatlarında daha yüksek oranda tespit edilmiş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.085$) (Tablo IV). Klinik örneklerle *efa* hariç diğer genler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). *efa* geni kan örneklerinde diğer örneklerle



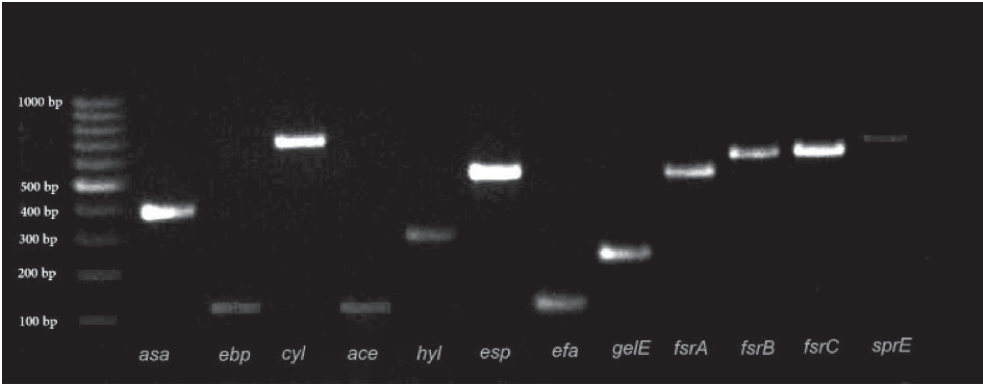
Resim 3. Jelatinaz aktivitesi pozitif (sol) ve negatif (sağ) izolat.



Resim 4. Hidrojen peroksit aktivitesi negatif (sol) ve pozitif (sağ) (Enterococcus faecalis ATCC 29212 standart suşunun hidrojen peroksit aktivitesi pozitifdir).

Tablo IV. *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* İzolatlarında Virülans Faktörlerinin Dağılımı

Virülans faktörleri	<i>E.faecium</i> (n= 61)		<i>E.faecalis</i> (n= 49)		p	Toplam (n= 110)	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde		Sayı	Yüzde
Hemolizin	1	1.6	25	51.0	0.000	26	23.6
Biyofilm	7	11.5	4	8.2	0.752	11	10.0
Jelatinaz	1	1.6	13	26.5	0.000	14	12.7
<i>ebp</i>	19	31.1	47	95.9	0.000	66	60.0
<i>asa1</i>	22	36.1	28	57.1	0.035	50	45.5
<i>esp</i>	34	55.7	39	79.6	0.009	73	66.4
<i>cylA</i>	22	36.1	34	69.4	0.001	56	50.9
<i>hyl</i>	33	54.1	18	36.7	0.085	51	46.4
<i>efa</i>	53	86.9	49	100	0.008	102	92.7
<i>ace</i>	43	70.5	49	100	0.000	92	83.6
<i>gelE</i>	5	8.2	32	65.3	0.000	37	33.6
<i>sprE</i>	5	8.2	32	65.3	0.000	37	33.6
<i>fsrA</i>	1	1.6	13	26.5	0.000	14	12.7
<i>fsrB</i>	1	1.6	12	24.5	0.000	13	11.8
<i>fsrC</i>	5	8.2	32	65.3	0.000	37	33.6



Resim 5. *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* izolatlarında PCR ile saptanan virülans genlerinin jel görüntüsü. *asa*: 375 baz çifti (bp), *ebp*: 101 bp, *cyl*: 688 bp, *ace*: 101 bp, *hyl*: 276 bp, *esp*: 510 bp, *efa*: 101 bp, *gelE*: 213 bp, *fsrA*: 484 bp, *fsrB*: 574 bp, *fsrC*: 580 bp ve *sprE*: 660 bp.

göre daha düşük oranda tespit edilmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.013).

PCR ile saptanan virülans genlerinin örnek jel görüntüleri Resim 5'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Son yıllarda enterokoklar ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olan patojenler olarak ortaya çıkmışlardır. Pek çok antimikrobiyal ilaca karşı direnç göstermeleri, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalarda üremelerine ve süperenfeksiyonlara neden olmaktadır. Klasik olarak *E.faecalis*'in daha çok enfeksiyon oluşturduğu, *E.faecium*'un ise antibiyotiklere daha dirençli olduğu bilinmektedir¹³. Çalışmamızda *E.faecium* izolatlarının ampisilin, siprofloksasin, YDS, vankomisin, teikoplanin ve linezolide *E.faecalis* izolatlarına göre daha dirençli, tetrasiklin ve YDG'ye ise daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Bu fark ampisilin, siprofloksasin, tetrasiklin ve YDS için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, diğer antibiyotikler için anlamlı bulunmamıştır (Tablo III). Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada da ampisilin, penisilin ve vankomisine *E.faecium* izolatlarının *E.faecalis* izolatlarına göre daha dirençli olduğu saptanmıştır¹⁴.

Enterokoklarda plazmitlere direnç gösteren izolatların sayısı giderek artmaktadır. Kafil ve arkadaşları⁹ İran'da yaptıkları çalışmada vankomisin direncini *E.faecalis* ve *E.faecium* için sırasıyla %16.3 ve %33.8 olarak bildirmişlerdir. Ülkemizde Baylan ve arkadaşlarının⁷ yaptıkları çalışmada *E.faecalis* izolatlarında vankomisine direnç görülmezken, *E.faecium* izolatlarında %25.8 oranında direnç tespit edilmiştir. Çalışmamızda vankomisin ve teikoplanin direnci 5 (%8.2) *E.faecium* izolatında tespit edilmiş, *E.faecalis* izolatlarında saptanmamıştır. Bu düşük glikopeptit direncinin nedeni, sadece enfeksiyon etkeni kabul edilen izolatlar çalışmaya dahil edildiği için dışı izolatlarının alınmaması olabilir. Ayrıca proje kaynakları kısıtlı olduğu için çalışma belli sayıda izolatla sınırlandırılmıştır.

Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozit direnci, endokardit ve bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde zorluklara neden olmaktadır. Çalışmamızda YDG direnci *E.faecalis* izolatlarında (%41.7) *E.faecium*'a (%37.7) göre daha yüksek oranda tespit edilmiş ancak iki tür arasında YDG direnci açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. YDS direnci ise *E.faecium* izolatlarında (%73.8) *E.faecalis*'e (%54.2) göre daha yüksek saptanmış ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.043). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da benzer olarak YDG direnci *E.faecalis*'de %47.1, *E.faecium*'da %40.7, YDS direnci ise *E.faecalis*'de %55.8, *E.faecium*'da %63.7 olarak bildirilmiştir¹⁴. Ancak Baylan ve arkadaşları⁷ hem YDG hem de YDS direncini *E.faecium*'da daha yüksek oranda saptamışlardır. Bu farkın çalışmaya alınan izolat sayısına, izolatların soyutlandığı klinik örneklerle, etken ya da kolonizan olmalarına göre değişiklik gösterebileceği düşünülmüştür.

Linezolid, günümüzde dirençli gram-pozitif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlar için önemli bir tedavi seçeneğidir. Linezolide direnç Türkiye'de ilk defa Aktaş ve arkadaşları¹⁵ tarafından *E.faecium* izolatlarında %2 oranında bildirilmiştir. Çalışmamızda *E.faecium* izolatlarında %1.8 oranında linezolide direnç belirlenmiş, *E.faecalis* izolatlarında ise saptanmamıştır. Patel ve arkadaşları¹⁶ da sadece *E.faecium* izolatlarında linezolide direnç (%0.4) bildirmişlerdir.

Enterokoklarda enfeksiyonun şiddetini artırması nedeniyle hemolizin üretimi virülans büyük öneme sahiptir. Hasani ve arkadaşları¹⁷ *E.faecalis* izolatlarının %19.5'inin beta-he-

molitik özellikte olduğunu tespit etmişlerdir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada izolatların hemolizin üretme oranı %38 olarak bildirilmiştir¹⁸. Bizim çalışmamızda *E.faecalis* izolatlarının %51'inin, *E.faecium* izolatlarının ise %1.6'sının hemolizin ürettiği tespit edilmiştir. Ülkemizde Baylan ve arkadaşları⁷ hemolizin üretimini *E.faecalis* izolatlarında %16.9 olarak bildirmişler, *E.faecium* izolatlarında saptamamışlardır. Ancak başka bir çalışmada *E.faecalis* izolatlarında bizim çalışmamıza benzer oranda (%42.8) tespit edilirken, *E.faecium* izolatlarında oldukça yüksek oranda (%31.9) saptanmıştır¹⁴. Bunun nedeninin fenotipik testlerin değerlendirilmesinde kişisel yorum ve izolat farkı olabileceği düşünülmüştür.

Jelatinaz, kollajen, fibrinojen, fibrin ve kompleman bileşenleri gibi konak substratlarının parçalayarak virülansa katkıda bulunduğu hücre dışı bir çinko-metalloproteazdır. Soares ve arkadaşları¹⁹ jelatinaz pozitifliğini *E.faecalis* izolatlarında %33.5, *E.faecium* izolatlarında ise %5.3 oranında bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da jelatinaz pozitifliği *E.faecalis* izolatlarında %26.5, *E.faecium* izolatlarında %1.6 saptanmış, iki tür arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.000$). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir^{7,14}.

Bakterilerdeki biyofilm yapısı, patojen bakterileri birçok dezenfektan ve antimikrobiyalardan koruyarak tedavisi güç kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Soares ve arkadaşları¹⁹ *E.faecalis* izolatlarının %87.3'ünün, *E.faecium* izolatlarının %10.5'inin biyofilm ürettiğini, noninvaziv izolatlar ve biyofilm oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda *E.faecium* izolatlarının 7 (%11.5)'sinde, *E.faecalis* izolatlarının 4 (%8.2)'ünde biyofilm üretimi tespit edilmiş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p= 0.752$). Enterokoklarda biyofilm oluşumu karmaşık ve çok faktörlüdür; bu nedenle virülans faktörleri arasındaki yeri tartışmalıdır²⁰.

Bir plazmit (*asa1* geni) tarafından kodlanan agregasyon faktörü, bakterinin renal tübül hücrelere adezyonunu ve insan makrofajlarına bağlanmasını sağlamaktadır. Sharifi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada¹³ *asa1* gen pozitifliğini *E.faecalis* izolatlarında %69.8, *E.faecium* izolatlarında ise %8 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda da *asa1* gen pozitifliği *E.faecalis* izolatlarında (%57.1), *E.faecium* izolatlarında (%36.1) göre yüksek oranda tespit edilmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0.035$). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da *asa1* geni *E.faecalis* izolatlarında *E.faecium* izolatlarına göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur¹⁴. Bu veriler *asa1* geninin *E.faecalis*'de *E.faecium*'a göre daha yaygın bir virülans faktörü olduğunu göstermektedir.

Enterokokların kolonizasyonu ve biyofilm oluşumunda rol alan hücre duvarı ile ilişkili proteinlerden biri enterokok yüzey proteindir (*esp*). Malezya'da yapılan bir çalışmada *esp* geni *E.faecalis* izolatlarında %49.2, *E.faecium* izolatlarında ise %30.8 oranında bildirilmiştir²¹. Çalışmamızda *esp* geni *E.faecalis* izolatlarında %79.6, *E.faecium* izolatlarında %55.7 oranında saptanmıştır. Saba Çopur ve arkadaşları²² *E.faecalis* izolatlarında %73.9, *E.faecium* izolatlarında ise %79.6 oranında *esp* pozitifliği bildirmişlerdir. *esp*'nin *E.faecium*'da saptanan tek virülans geni olduğu ve dünyadaki hastane salgınlarıyla ilişkili olan *E.faecium*'un özel bir soyu olan klonal kompleks 17'nin önemli bir özelliği olduğu bil-

dirilmiştir²³. Ancak bizim çalışmamızda ve ülkemizde yapılan diğer çalışmada *E.faecium* izolatlarında *esp* ile birlikte birçok virülans geni saptanmıştır²².

Prokaryot ve ökaryot hücreleri lizise uğratma yeteneğine sahip olan sitolizin *cyl* genleri tarafından kodlanır. İran'da yapılan bir çalışmada *cyl* gen pozitifliği *E.faecalis* izolatlarında %30.4, *E.faecium* izolatlarında ise %11 olarak bildirilmiştir²³. Çalışmamızda, *E.faecalis* izolatlarında %69.4, *E.faecium* izolatlarında %36.1 oranında *cylA* geni tespit edilmiştir. Saba Çopur ve arkadaşları²² yaptıkları çalışmada *E.faecalis* izolatlarında *cylA* genini %27.3, *E.faecium*'da ise %2.2 oranında bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan bu iki çalışma arasındaki farkın çalışmaya alınan izolatların soyutlandığı klinik örneklerden, etken ya da kolonizan olmalarından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Hiyalüronidaz enzimi bağ dokusundaki mukopolisakaritleri ve hiyalüronik asidi parçalayarak doku hasarına ve bakterinin yayılmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda *hyl* geni diğer genlerden farklı olarak *E.faecium* izolatlarında (%54.1) *E.faecalis* izolatlarına (%36.7) göre daha yüksek oranda saptanmış ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da *hyl* geni *E.faecium* izolatlarında (%38.7-15.1) *E.faecalis*'e (%1.7-4.3) göre oldukça yüksek bildirilmiştir^{7,22}. Arabestani ve arkadaşları²⁴ da *hyl* genini *E.faecium*'da (%71.6) *E.faecalis*'e (%56.6) göre daha yüksek tespit etmişlerdir. Bu durum, bakterinin dokulara invazyonunu sağlayan hiyalüronidaz enziminin *E.faecium*'un invaziv örneklerden daha çok izole edilmesinin bir nedeni olabileceğini göstermektedir.

E.faecalis antijen A proteinin, enterokokların adezyonunu sağladığı bildirilmekle birlikte enfeksiyondaki rolü hala tartışmalıdır. Lindenstraub ve arkadaşları¹² *efa* genini *E.faecalis* izolatlarının %65'inde, 10 *E.faecium* izolatının tümünde tespit etmişlerdir. Heidari ve arkadaşları²³ da *E.faecalis* izolatlarında %100, *E.faecium* izolatlarında ise %22 oranında *efa* gen pozitifliği saptamışlardır. Bizim çalışmamızda *efa* en yüksek oranda belirlenen virülans genidir ve *E.faecalis* izolatlarının tamamında, *E.faecium* izolatlarının ise %86.9'unda tespit edilmiştir. Ayrıca *efa* geni kan örneklerinde diğer örneklerle göre daha düşük oranda tespit edilmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.013$). Bunun nedeni enterokokların coğrafi kökenlerine göre genetik olarak birbirlerinden farklı olması ve izole edilen örneklerin çeşitliliği olabilir.

Adeziv matriks molekülleri ailesine ait kollajen bağlayan protein olan *ace*'nin klinik izolatlarda fekal izolatlardan daha fazla olduğu belirtilmiştir²⁵. İran'da yapılan bir çalışmada *ace* geni *E.faecalis* izolatlarında %89.1 oranında, *E.faecium*'da ise bir izolatta tespit edilmiştir²³. Tunus'ta yapılan bir çalışmada *ace* geni *E.faecalis*'de %64.7, *E.faecium*'da %35 oranında bildirilmiştir²⁶. Çalışmamızda *ace* geni *E.faecalis* izolatlarında %100, *E.faecium* izolatlarında %70.5 oranında saptanmıştır.

Jelatinaz, *gelE* tarafından kodlanan bir çinko metalloproteazdır ve doku invazyonunda önemli bir rolü vardır. Bizim çalışmamızda *E.faecalis* izolatlarında %65.3, *E.faecium* izolatlarında %8.2 oranında *gelE* geni tespit edilmiş ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Soares ve arkadaşları¹⁹ *E.faecalis* izolatlarında %78.7, *E.faecium*'da %10.5 oranında saptanmıştır.

mışlardır. Ülkemizde Saba Çopur ve arkadaşları²² *E.faecalis*'de %52.2, *E.faecium*'da %3.2; Mete ve arkadaşları¹⁴ *E.faecalis*'de %12.3, *E.faecium*'da %1.1 oranında *gelE* geni tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu durum, *E.faecalis*'in virülansında *gelE*'nin önemini göstermektedir.

Serin proteaz *E.faecalis* tarafından salgılanan proteazlardan biridir ve üriner sistem enfeksiyonlarında virülans için gereklidir. Al-Talib ve arkadaşları²¹ yaptıkları bir çalışmada *sprE* genini *E.faecalis* izolatlarında %76, *E.faecium*'da ise %66.7 oranında bildirmişlerdir. Çalışmamızda *E.faecalis*'de %65.3, *E.faecium*'da %8.2 oranında *sprE* geni pozitifliği tespit edilmiştir. *gelE-sprE* genleri aynı operonda transkript edilmekte ve ekspresyonları Fsr-quorum sensing sistemi tarafından kontrol edilmektedir²⁷. Golinska ve arkadaşları²⁸ yaptıkları çalışmada 16 *E.faecalis* izolatında bir *fsrA*, iki *fsrB* ve altı *fsrC*; sekiz *E.faecium* izolatında ise iki *fsrA*, bir *fsrB* ve bir *fsrC* bildirmişlerdir. Çalışmamızda, *E.faecalis* izolatlarında 13 *fsrA*, 12 *fsrC*, 32 *fsrC*; *E.faecium* izolatlarında ise bir *fsrA*, bir *fsrB* ve beş *fsrC* geni tespit edilmiştir. Bu sonuç çalışmaya alınan izolatlarda *gelE-sprE* genlerinin ekspresyonlarının *fsr* genleri tarafından kontrol edildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda biyofilm üretimi ve *hyl* geni hariç virülans faktörlerinin *E.faecalis* izolatlarında daha yüksek oranda bulunduğu ve *E.faecium* türlerinin ise anti-biyotiklere daha dirençli olduğu saptanmıştır. Hastane ortamında bu tür virülans veya dirençli izolatların enfeksiyonunu önlemek için enfeksiyon kontrol önlemlerine uyulması gerekmektedir. Enterokokların virülansının daha iyi anlaşılması için in vivo çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Teixeira LM, Siqueira Carvalho MDG, Facklam RR. *Enterococcus*, pp: 430-42. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington DC.
2. Paganelli FL, Huebner J, Singh KV, Zhang X, van Schaik W, Wobser D, et al. Genome-wide screening identifies phosphotransferase system permease BepA to be involved in *Enterococcus faecium* endocarditis and biofilm formation. J Infect Dis 2016;214(2):189-95.
3. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol 2012;10(4):266-78.
4. Comerlato CB, de Resende MC, Caierao J, d'Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108(5):590-5.
5. Diani M, Arioifar MN, Akçelik N. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. Turk Hij Den Biyol Derg 2016;73(1):71-80.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania USA, 2013.
7. Baylan O, Nazik H, Bektöre B, Çitil BE, Turan D, Öngen B ve ark. Üriner enterokok izolatlarının antibiyotik direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişki. Mikrobiyol Bul 2011;45(3):430-45.

8. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol* 2012;61(5):209-16.
9. Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF. Adhesion and virulence factor properties of enterococci isolated from clinical samples in Iran. *Indian J Pathol and Microbiol* 2013;56(3):238-42.
10. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, 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.
11. 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.
12. Lindenstraub AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Syst Appl Microbiol* 2011;34(8):553-60.
13. Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Naghili B, Aghazadeh M, Milani M, et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. *Adv Pharm Bull* 2013;3(1):197-201.
14. Mete E, Kaleli İ, Cevahir N, Demir M, Akkaya Y, Kiriş Satılmış Ö. Enterokok türlerinin virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2017;51(2):101-14.
15. Aktaş G, Bozdoğan B, Derbentli Ş. Linezolid ve dalbavansinin vankomisine dirençli enterokok izolatlarına karşı *in vitro* aktivitesi. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(3):359-65.
16. Patel SN, Memari N, Shahinas D, Toye B, Jamieson FB, Farrell DJ. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* isolated in Ontario, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;77(4):350-3.
17. Hasani A, Sharifi Y, Ghotaslou R, Naghili B, Hasani A, Aghazadeh M, et al. Molecular screening of virulence genes in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens in Northwest Iran. *Indian J Med Microbiol* 2012;30(2):175-81.
18. Komiya EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, Samaranyake LP, Parahitayawa NB, Balducci I, et al. *Enterococcus* species in the oral cavity: prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *PLoS One* 2016;11(9):e0163001.
19. Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierao J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 2014;5(5):634-7.
20. Almoahamad S, Somarajan SR, Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Influence of isolate origin and presence of various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2014;353(2):151-6.
21. Al-Talip 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.
22. Saba Çopur Ş, 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.
23. Heidari H, Emaneini M, Dabiri H, Jabalameli F. Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of enterococcal strains isolated from burn patients. *Microb Pathog* 2016;90:93-7.
24. Arabestani MR, Nasaj M, Mousavi SM. Correlation between infective factors and antibiotic resistance in enterococci clinical isolates in West of Iran. *Chonnam Med J* 2017;53(1):56-63.
25. Sillanpää J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pilli in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2009;47(4):896-901.
26. Sallem RB, Klibi N, Klibi A, Ben Said I, Dziri R, Boudabous A, et al. Antibiotic resistance and virulence of enterococci isolates from healthy humans in Tunisia. *Ann Microbiol* 2016;66(2):717-25.
27. Xu W, Flores-Mireles AL, Cusumano ZT, Takagi E, Hultgren SJ, Caparon MG. Host and bacterial proteases influence biofilm formation and virulence in a murine model of enterococcal catheter-associated urinary tract infection. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017;3:28.
28. Golinska E, Tomusiak A, Gosiewski T, Wiecek G, Machul A, Mikolajczyk D, et al. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2013;19(23):3562-72.