



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ANALİZ**

Dr. Faruk KARAKEÇİLİ

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2011



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

VANKOMİSİNE DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİK ANALİZ

Dr. Faruk KARAKEÇİLİ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt ÖZAKIN

BURSA-2011

İÇİNDEKİLER

| | |
|------------------------|----|
| Özet..... | ii |
| Summary..... | iv |
| Giriş..... | 1 |
| Gereç ve Yöntem..... | 39 |
| Bulgular..... | 51 |
| Tartışma ve Sonuç..... | 66 |
| Kaynaklar..... | 79 |
| Teşekkür..... | 86 |
| Özgeçmiş..... | 87 |

ÖZET

Enterokoklar, birçok bakteri türünde bulunan virülans faktörlerine sahip olmamalarına rağmen çevre şartlarına oldukça dirençlidir. Çeşitli antibiyotiklere karşı doğal veya kazanılmış direnç göstermeleri, enterokokların son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli etyolojik ajanlar arasında yer almasına neden olmuştur.

Vankomisine dirençli enterokok (VRE) enfeksiyonlarının kontrolünde, bu bakteri ile kolonize olan hastaların erken tespiti ve nozokomiyal salgın ile ilişkilerinin gösterilmesi önemlidir. Nozokomiyal epidemiler sırasında izole edilen VRE suşları arasındaki klonal ilişkinin tespiti için moleküler yöntemler kullanılmalıdır. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE); nozokomiyal salgın sürveyansında, salgın suşları arasındaki ilişkinin gösterilmesi ve salgın kaynağının tespitinde “altın standart” yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada hastanede yatan hastalardan izole edilen VRE suşlarının, hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi açısından PFGE ve Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR) yöntemleri kullanılarak klonal ilişkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

Ocak 2001 ile Aralık 2009 yılları arasında hastanede yatan hasta örneklerinden izole edilen tüm VRE türleri içinde *Enterococcus faecium*'un %98'lik bir oranla baskın tür olduğu saptandı. Çalışmaya 9 yıllık periyot boyunca, 5 ayrı muhtemel epidemide izole edilen suşlardan 83 adet *E. faecium* suşu dahil edildi. Tüm suşların yüksek düzey glikopeptid direncine sahip olduğu saptandı.

PFGE yöntemiyle 2001 ile 2002 yılı epidemilerinde izole edilen birçok suş arasında anlamlı benzerlik olduğu, bu klonun varlığını uzun süre koruduğu ve bu iki epidemide baskın hale geldiği saptandı. Diğer 3 epidemide izole edilen suşların kendi içinde benzediği, ancak farklı epidemiler arasında anlamlı bir suş benzerliği olmadığı belirlendi. Özellikle 2009 yılındaki epidemide tüm suşların tek bir klonal kümede toplandığı, daha önce hasta örneklerinde izole edilmeyen yeni bir suşun tüm hastaneye yayıldığı saptandı.

PFGE, ayırım gücü yüksek, tekrarlanabilirliği çok iyi, laboratuvarlar arası standardize edilebilen ve salgın sörveyansında güvenilir bilgiler sunan bir moleküler epidemiyolojik yöntem olarak değeriendirildi.

Anahtar kelimeler: Moleküler epidemiyolojik analiz, PFGE, AP-PCR, VRE.

SUMMARY

Molecular Epidemiologic Analysis on Vancomycin Resistant Enterococci

Enterococci are highly resistant to environmental conditions, though they do not have the virulence factors in many bacterial species. In recent years, Enterococci have caused to take part between important etiologic agents at nosocomial infections since they have natural or acquired the resistance to various antibiotics.

It is important of the early detection of patients colonized with these bacteria and the demonstration of relations with nosocomial epidemic in the control of vancomycin-resistant enterococci (VRE) infections. Molecular methods should be used to detect the clonal relationship between isolated VRE strains during epidemics of nosocomial. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), is considered as golden standard method for demonstration of relationship between the epidemic strains and determining the source of the epidemic in the surveillance of nosocomial epidemic. In this study, it is aimed to detect clonal relationships of VRE strains isolated from the hospitalized patients by PFGE and arbitrarily primed PCR (AP-PCR) methods in terms of the epidemiology of hospital infections.

Between January 2001 and December 2009, *Enterococcus faecium* was found to be the dominant species in all VRE isolated from hospitalized patients, which have rate of 98%. 83 strains of *E. faecium* were included in the study, which isolated from 5 different possible epidemic periods during 9 years. It was found that all strains have high-level glycopeptide resistance.

Through PFGE method, it was determined that there was a significant similarity between many strains isolated from between 2001 and 2002 epidemics, this clone was maintained the existence for a long time and it had become the dominant in these two epidemics. It was also determined that the strains isolated in other 3 epidemic periods were similar to

themselves, but there was no significant similarity to a strain between different epidemics. Especially during the 2009 epidemic period, it was found that all strains were collected in a single clonal cluster, the new strain which were not previously isolated from samples of patients was spread to all units of the hospital.

It was evaluated that PFGE was a molecular epidemiological method which have high separation power, can be standardized between laboratories and provide reliable information on the epidemic surveillance

Keywords: Molecular epidemiological analysis, PFGE, AP-PCR, VRE.

GİRİŞ

Enterokoklar, çevre şartlarına oldukça dirençli bakteriler olmakla birlikte diğer birçok bakteri türünde mevcut olan virülans faktörlerine sahip değildir. Çeşitli antibiyotiklere intrinsek dirençli olmaları ve yeni direnç geliştirebilme yeteneklerinin olması, enterokokların son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli etyolojik ajanlar arasında yer almasına neden olmuştur (1). Önceleri normal barsak florasının elemanı ve düşük virulanslı patojenler arasında yer alan enterokoklar, yıllar içinde nozokomiyal bakteriyemi, cerrahi yara enfeksiyonları ve üriner sistem enfeksiyonlarında başta olmak üzere etken olarak klinisyenlerin karşısına daha sık çıkan ve giderek önem kazanan etkenlerden biri haline getirmiştir (2). Yoğun ve hatalı antibiyotik kullanımı, başta aminoglikozid grubu olmak üzere glikopeptit türevi antibiyotikler dahil birçok antibiyotiğe karşı enterokokların direnç geliştirmesine neden olmuştur (3, 4).

Enterokokların etken olduğu enfeksiyonların genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen enfeksiyonlar şeklinde olduğu düşünülmekteyken, yapılan çalışmalar, ekzojen yolla da enfeksiyona neden olabileceğini göstermiştir. Özellikle antibiyotiklere dirençli türler, hastadan hastaya veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabilmektedir. Böylece hastane içinde veya hastaneler arasında yayılarak salgınlara da sebep olabilmektedir (1, 5). Hastanede yatan hastalarda kullanılan antibiyotiklerin ve bazı antineoplastiklerin barsak florasını ve anatomik yapısını bozması sonucu bakterinin barsak lümeninden translokasyon yoluyla genel dolaşıma karışması, endojen kökenli bakteriyemi ve endokardit oluşmasına sebep olabilmektedir.

Son yıllarda, enterokokların antibiyotik direncindeki artma ve çoğul dirençli suşların ortaya çıkması tedavilerini de önemli bir sorun haline getirmiştir. İlk olarak 1988 yılında İngiltere ve Fransa'da vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) bildirildikten sonra diğer Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) de dirençli suşlar ortaya çıkmaya başlamış ve

sorun bütün dünyaya yayılmıştır. Enterokok türlerinden, özellikle *Enterococcus faecium* glikopeptit direncinin yayılmasından sorumlu tutulmaktadır (6).

Günümüzde VRE'lerle gelişen enfeksiyonlar genel olarak hastane enfeksiyonlarında dördüncü, üriner sistem ve cerrahi yara enfeksiyonlarında ikinci, kan dolaşımı enfeksiyonlarında ise üçüncü sıklıkta görülmektedir. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VR *E. faecium*) suşlarının insidansı ABD'de %20-40, bazı Avrupa ülkelerinde %10'un üzerindedir (7).

Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Birimi (NNIS) verilerine göre VRE'lerin oranı 1989'da %0,3 iken, 1993'te %7,9'a, 2004'te %28'e yükselmiştir (8). Avrupa'da Yunanistan ve Portekiz, %45'in üzerine çıkan VRE oranları ile prevalansının en yüksek olduğu ülkelerdir (9).

Hastanede yatan hastalarda VRE kolonizasyonunun erken tespiti, VRE yayılmasının önlenmesinde ve bu suşların salgın suşları ile ilişkisinin gösterilmesinde önemlidir. VRE epidemileri sırasında önceleri salgın suşları arasındaki ilişkinin gösterilmesinde fenotipik özelliklere dayalı yöntemler (biyokimyasal özellikler, antibiyotipleme, westernblotting ve multilokus enzim elektroforezi (MLEE) gibi) kullanılmıştır. Ancak bu yöntemlerin hem ayırım gücü hem de tekrarlanabilirliği düşüktür. Ayrıca pahalı ve zaman alıcı yöntemlerdir. Bu nedenle günümüzde tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü daha yüksek olan moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılmaktadır. VRE epidemilerinde, salgın suşları arasındaki ilişkinin tespitinde genotipe dayalı başlıca moleküler yöntemlerden Randomly Amplified Polimorfik DNA(RAPD)/Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR), Multilokus sekans tipleme (MLST) ve Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) sıklıkla kullanılmaktadır. Salgınlara yol açan birçok mikroorganizmada, izolatlar arası ilişkinin tespiti ve kaynağının gösterilmesinde, ayırım gücü en yüksek olan "altın standart" yöntem PFGE'dir (10-13).

Bu çalışmada; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Üniteleri ile çeşitli kliniklerde yatan hastalardan izole edilen VR *E.*

faecium izolatlarının hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi açısından PFGE ve AP-PCR yöntemleri kullanılarak klonal ilişkilerinin tespiti amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

Enterokok ismi ilk kez, Thiercelin (1899) tarafından Fransa'da yapılan bir çalışmada bakterinin barsak kaynaklı olduğunu belirtmek amacıyla "insan dışkısında kısa zincirler veya çiftler halinde görülen bakterileri" tanımlamak için kullanılmıştır (14). Andrews ve Holder (1906) dışkıdan izole ettikleri bakterilere *Streptococcus faecalis* adını vermişlerdir. Orla-Jensen (1919) bu grupta fermentasyon özellikleri *S. faecalis*'ten farklı olan *Streptococcus faecium* denilen ikinci bir organizma tanımlamışlardır (15).

Lancefield (1933) serolojik tiplendirme yöntemlerini kullanmış ve streptokokları alfabetik olarak A, B, C, D şeklinde 4 gruba ayırmıştır. Enterokoklar Grup D Streptokoklar içinde yer almıştır. J.M. Sherman ve Helen U. Wing ise (1935 ve 1937) *S. faecium*'a benzeyen ancak daha az fermentasyon özelliği gösteren üçüncü bir tür olarak *Streptococcus durans*'ı tanımlamışlardır (15). Kalina A. P. (1970) ilk kez enterokokal streptokoklar için bir cins oluşturulmasını, *S. faecalis* ve *S. faecium*'un hücresel dizilim ve fenotipik özelliklerine göre Enterococcus olarak isimlendirilmesini önermiştir. Bununla birlikte uzun bir süre enterokoklar, Lancefield sınıflamasına göre Grup D Streptokoklar olarak adlandırılmış ve *Streptococcus* cinsi içerisinde kalmıştır (14). Kilpper - Balz tarafından yapılan genetik çalışmalar sonucunda (1984) *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* suşları bu genusun diğer üyelerinden ayrılmış ve ayrı bir genus olarak ele alınmıştır. O zamandan beri bu genusa Enterococcus denilmektedir. Yakın zamana kadar enterokok cinsi içerisinde 34 civarında tür bulunduğu gösterilmiştir (Tablo-1) (16).

Tablo-1: Enterococcus cinsi içerisinde yer alan türler.

| | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Enterococcus aquimarinus</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Enterococcus pallens</i> |
| <i>Enterococcus asini</i> | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Enterococcus phoeniculicola</i> |
| <i>Enterococcus avium</i> | <i>Enterococcus gallinorum</i> | <i>Enterococcus pseudoavium</i> |
| <i>Enterococcus caccae</i> | <i>Enterococcus gilvus</i> | <i>Enterococcus raffinosus</i> |
| <i>Enterococcus canintestini</i> | <i>Enterococcus haemoperoxidus</i> | <i>Enterococcus ratti</i> |
| <i>Enterococcus canis</i> | <i>Enterococcus hermanniensis</i> | <i>Enterococcus saccharolyticus</i> |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | <i>Enterococcus hirae</i> | <i>Enterococcus silesiacus</i> |
| <i>Enterococcus cecorum</i> | <i>Enterococcus italicus</i> | <i>Enterococcus sulfureus</i> |
| <i>Enterococcus columbae</i> | <i>Enterococcus malodoratus</i> | <i>Enterococcus termitis</i> |
| <i>Enterococcus devriesei</i> | <i>Enterococcus moraviensis</i> | <i>Enterococcus thailandicus</i> |
| <i>Enterococcus dispar</i> | <i>Enterococcus mundtii</i> | <i>Enterococcus villorum</i> |
| <i>Enterococcus durans</i> | | |

Enterokoklar genel olarak insanların ve bazı hayvanların gastrointestinal sisteminde (GİS), dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde bulunur. İnsan dışkısında *E. faecalis* (10^5 - 10^7 cfu/gr), *E. faecium*'dan (10^4 - 10^5 cfu/gr) daha yaygın bulunur. Hastane ortamında ise *E. faecium* daha baskındır. Enterokoklar ayrıca vajina, deri, oral kavite ve dental plaklarda daha az sıklıkta bulunmaktadır (17, 18).

Laboratuvarlardan izole edilen izolatların %80-90'ını *E. faecalis*, %5-10 kadarını *E. faecium* izolatları oluşturmaktadır. Diğer enterokoklar ise (*E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. gallinorum*, *E. mundtii*, *E. flavescens*, *E. avium* ve *E. hirae*) nadir olarak klinik örneklerden izole edilmektedir (19).

1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Enterokoklar tekli, ikili ya da kısa zincirler yapmış, gram pozitif kok şeklinde, fakültatif anaerob bakterilerdir. Katı besiyerinde ürediğinde kok veya kokobasil şeklinde görülebilirken, sıvı besiyerlerinde ürediğinde daha uzun zincir şeklinde yapılar oluşturduğu gözlenir. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayırt edilemezler. *E. gallinorum* ve *E. casseliflavus* hariç, çoğu hareketsizdir (14, 20).

2. Üreme Özellikleri ve Fizyolojik Karakterleri

Enterokoklar kolay üreyen bakterilerdir. Genel amaçlı kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla ürerler. Bununla birlikte *Enterococcus columbae* ve *Enterococcus cecorum* üremek için CO₂'den zengin besiyerine ihtiyaç duyarlar. Diğer türler üremek için ortamda CO₂ varlığına ihtiyaç duymamakla beraber, CO₂ varlığında daha rahat ürerler (14, 21). Agarda üreyen kolonilerden yapılan gram boyamada bazen gram pozitif kokobasil şeklinde görülebilirler. 10 – 45°C arasında üreyebilirler ancak en ideal üreme ısıları 35°C'dir. Çevre şartlarına dayanıklı bakterilerdir. pH:9'da, 10°C'de, %6,5 NaCl ve ya %40 safra varlığında üreyebilirler. 60°C'ye 30 dakika dayanıklıdırlar. Kanlı agarda streptokoklara göre daha büyük, 0.5 – 1.5 mm boyutunda, kabarık, gri - beyaz renkte S tipi koloniler yaparlar. Nadiren R tipi koloni de yaparlar. Genellikle nonhemolitikler. Nadiren zayıf bir α veya β hemoliz meydana getirebilirler. *E. faecalis* ve *E. durans* suşları kanlı agarda β -hemoliz yapabilirler. *E. faecalis*'in bazı suşları at veya tavşan kanı içeren besiyerlerinde β -hemoliz yapmalarına rağmen, koyun kanı içeren besiyerlerinde hemoliz yapmazlar. Diğer türlerin tamamı genellikle α -hemolitik veya nonhemolitikdir. Gerçekte α -hemolitik görünen suşlar da peroksit üreten nonhemolitik suşlardır. Besiyerinde oluşan yeşil renk α -toksin üretimi yoluyla değil, eritrositlerde peroksitin etkisi ile oluşmaktadır. *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* ve *E. sulfureus* kanlı agarda sarı pigment oluştururlar (15, 21, 22).

Karışık örneklerden enterokok izolasyonu için selektif besiyerleri kullanmak gerekir. Selektif besiyerlerinden azid içeren safra-eskülin-azid agar, Enterococcosel agar, feniletal alkol agar (PEA) ve Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar (CNA) kullanılmaktadır. Selektif besiyerlerinin içerdiği kimyasal maddelerin özelliklerine bağlı olarak koloni rengi değişebilir. Kontamine alanlardan özellikle *E. faecium* izolasyonu için de sefaleksinsaztreonam-arabinoz agar kullanılabilir. VRE suşlarının saptanması için 6 μ g/ml vankomisin ilave edilmiş brain-heart infüzyon agar (BHI) veya Enterococcosel sıvı besiyeri kullanılabilir (19).

3. Biyokimyasal Özellikleri

Enterokoklar, eskülini hidrolize ederler. Bile-Esculine (BE) agarda rahatlıkla ürerler. Bu özelliklerinden dolayı, besiyerlerinde indikatör olarak eskülin kullanılabilir. Eskülinli besiyerinde üreyen kolonilerin etrafında kahverengi-siyah bir hale oluşur. *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* ve *E. saccharolyticus* dışındaki türlerin tümü pyrolidonyl arylamidase (PYRase) üreterek pyrolidonyl-b-naftilamide (PYR)'i hidrolize ederler. Tüm enterokoklar leucine aminopeptidase (LAPase) üretirler ve leucine β -naphthylamide'i hidrolize ederler. Katalaz testi sitokrom enzimleri olmadığından dolayı negatiftir. Ancak bazı *E. faecalis* suşları özellikle ilk izolasyonları sırasında psödokatalaz üretir ve katalaz testinde zayıf bir pozitiflik yapabilir. Seri pasajlarda bu yalancı pozitiflik kaybolur. Glukozu gaz yapmadan fermente ederler. Glukoz fermentasyonunun son ürünü laktik asittir (22, 23).

Enterokoklar bazal metabolizmaları için bir karbon kaynağına, nükleik asit bazlarına ve B1, B6, B12 vitaminlerine ihtiyaç duyarlar. *E. faecalis* histidin, izolösin, metionin ve triptofan aminoasitlerine ihtiyaç duyarken, diğer bazı türler arginin, glutamat, glisin, lösin ve valin'e ihtiyaç duyarlar. Bazı türler ise bu aminoasitlere ihtiyaç duymazlar. Vankomisine bağımlı suşlarda olduğu gibi yoğun antimikrobiyal baskı sonucu metabolik ihtiyaçlar etkilenmektedir. Bu da enterokok türlerinin metabolik ihtiyaçlarının suştan suşa bile farklı olabileceğini göstermektedir (14, 19).

4. Hücre Duvar Yapısı ve Antijenik Özellikleri

Enterokoklardaki hücre duvar yapısı diğer gram pozitif koklara benzer şekildedir. Hücre duvarının üç ana bileşeni peptidoglikan, teikoik asit ve polisakkaritlerdir. Peptidoglikan duvar yapısının %40'ını oluşturur. Geri kalan kısım ramnoz içeren polisakkaritler ve ribitol içeren teikoik asitten oluşur. Peptidoglikan polimerleri, glikan zincirler ve bunlara bağlanmış kısa peptitlerden (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) oluşur. Komşu peptitler, pentapeptid yan zincirler ile çapraz bağlanırlar. Peptidoglikan dışı yardımcı polimerlerin yapısal bileşimi kesin olarak bilinmemektedir.

Lancefield sınıflamasında; serolojik tiplendirme temeline dayalı olarak streptokokların çoğu, baskın olan hücre duvarı karbonhidratlarına göre

sınıflandırılırken, enterokokların yer aldığı “D” grubunda lipoteikoik asitlerin (LTA) antijenik özelliklerine göre yapılır. Gruba özelliğini veren “D” antijeni, gliserol ünitelerine bağlanmış yüksek oranda glukoz içeren poligliserolfosfatın teikoik asit polimeridir. Enterokoklar D grubu antiserumlarla %80 oranında aglütinasyon verirler. Grup D antijeni enterokoklar dışında, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. suis*, *Pediococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. gibi diğer gram pozitif bakterilerde de bulunabilmektedir. Enterokokların bu türlerden ayrımı için kullanılan özellikler Tablo-2’de sunulmuştur (14, 19).

Tablo-2: Enterokokları diğer katalaz negatif, fakültatif anaerop, gram pozitif koklardan ayırt etmede kullanılan özellikler.

| Genus | Morfoloji | Hareket | VAN | PYR | BE | NaCl | 10°C’de üreme | 45°C’de üreme |
|---------------|-----------------|---------|-----|-----|----|------|---------------|---------------|
| Enterococcus | Zincir | D | S | + | + | + | + | D |
| Streptococcus | Zincir | – | S | – | – | – | – | – |
| Lactococcus | Zincir | – | S | – | + | D | + | – |
| Leuconostoc | Zincir | – | R | – | D | D | + | – |
| Pediococcus | küme, tetrat | – | R | – | + | D | – | – |

D: Değişken, **S:** Duyarlı, **R:** Dirençli, **VAN:** Vankomisin (30 µg disk) duyarlılığı, **PYR:** L-pyrrolydonyl- β-naphthylamide hidrolizi, **BE:** Safırlı eskulin hidrolizi, **NaCl:** % 6,5 NaCl içeren besiyerinde üreme

5. Sınıflandırma ve İdentifikasyon

Enterokokların sınıflandırılmasında kullanılan ana testler; mannitol, sorbitol ve sorboz içeren besiyerlerinde asit oluşturma ve arginini hidrolize etmeleri temeline dayanır (Şekil-1). Bu testlere göre enterokoklar beş gruba ayrılırlar. Enterokok türlerinin identifikasyonunda kullanılan testler ve sonuçları Tablo-3’te sunulmuştur (14).

Grup 1: Bu grup *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. pallens*, *E. gilvus*’dan oluşur. Bu gruptaki enterokoklar, mannitol, sorbitol ve sorbozu fermente ederek sıvı besiyerinde asit oluştururken arginini hidrolize etmezler. Grup içindeki ayrımları ise, arabinoz ve rafinozu fermente etmelerine göre yapılır. *E. avium*

arabinozu kullanır, rafinozu kullanmaz. *E. malodoratus* rafinozu kullanır, arabinozu kullanmaz. *E. raffinosus* her ikisini kullanırken, *E. pseudoavium* ise her ikisini de kullanmaz.

Grup 2: Bu grup *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E. mundtii*, *E. flavescens* ve *E. gallinorum*'dan oluşur. Bu gruptaki bakterilerin tümü mannitollü fermente ederek sıvı besiyerinde asit oluştururken, arginini hidrolize ederler. Hiçbiri sorbozdan asit oluşturmazken, sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler. *E. faecalis*, grup içinde tellüriti tolere edebilen ve pirüvatı kullanan tek türdür. *E. faecium* ve *E. gallinorum* hareket testi ile birbirinden ayrılır. *E. faecium* hareketsiz, *E. gallinorum* hareketlidir. *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. flavescens* sarı pigment oluştururlar. *E. mundtii* hareketsiz olmasıyla, *E. casseliflavus* ise ribozu fermente etmesiyle diğerlerinden ayrılır.

Grup 3: Bu grup *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hiraе*, *E. ratti* ve *E. faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantlarından oluşur. Bu gruptaki türler D antijeni içermez, arginini hidrolize ederler. Mannitol, sorbitol ve sorbozu fermente etmezler. *E. dispar* ve *E. hiraе*, rafinoz ve sukrozu fermente ederler. *E. dispar* pirüvatı kullanırken, *E. hiraе* kullanmaz. *E. faecalis* (varyant) ise tellüriti tolere eder, rafinoz ve sukrozu fermente etmez, pirüvatı kullanır.

Grup 4: Bu grup *E. sulfurens*, *E. asini*, *E. phoeniculicola* ve *E. cecorum*'dan oluşmaktadır. Bu gruptaki türler mannitol ve sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler. Sorbitol içeren sıvı besiyerinde ise *E. cecorum* asit oluştururken, *E. sulfureus* oluşturmaz.

Grup 5: Bu grup *E. columbae*, *E. canis*, *E. moraviensis*'ten oluşur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize etmezler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler (Şekil-1).

Tablo-3: Enterokok türlerinin fenotipik özellikleri (24).

| Grup,Tür | Grup D Antijen | Safra eskulin %6,5 | | | | Asit Üretimi | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|----------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-----|-----|---------|---------|-----|-----|-----|------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| | | agarda üreme | NaCl'de üreme | 10°C'de üreme | 45°C'de üreme | Sarı | LAP | PYR | Hareket | pigment | ADH | HIP | GLU | MNTL | SORB | ARB | SBTL | RAF | SUK | PRV | MPG |
| Grup I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. avium</i> | + | + | + | | + | + | + | - | - | - | D | + | + | + | + | + | - | + | + | D | |
| <i>E. gilvus</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | - | |
| <i>E. malodoratus</i> | + | + | + | | - | + | + | - | - | - | D | + | + | + | - | + | + | + | + | D | |
| <i>E. pallens</i> | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| <i>E. pseudoavium</i> | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | |
| <i>E. raffinosus</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | D | |
| <i>E. saccharolyticus</i> | - | | + | | | + | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | + | + | - | + | |
| <i>Enterococcus sp</i> | - | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | + | - | |
| Grup II | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. faecalis</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + | - | |
| <i>E. faecium</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + | - | + | D | D | + | - | - | |
| <i>E. casseliflavus</i> | + | + | + | | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | D | + | + | D | + | |
| <i>E. gallinarum</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | - | + | + | - | + | |
| <i>E. mundtii</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | - | + | D | + | + | - | - | |
| <i>E. haemoperoxidus</i> | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | + | |
| <i>Enterococcus sp</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - | |
| Grup III | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. dispar</i> | - | + | + | + | - | + | + | - | - | + | D | + | - | - | - | - | + | + | + | + | |
| <i>E. durans</i> | + | + | + | | + | + | + | - | - | + | D | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>E. hirae</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | + | + | - | - | |
| <i>E. ratti</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | D | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| <i>E. villorum</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Grup IV | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. asini</i> | + | + | - | D | D | + | + | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | D | |
| <i>E. cecorum</i> | - | | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | - | |
| <i>E. sulfuricus</i> | - | + | + | + | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + | + | - | + | |
| <i>E. phoeniculiicola</i> | - | - | - | - | | | | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| <i>Enterococcus sp</i> | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| Grup V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E. columbae</i> | - | + | + | | | + | - | - | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | - | |
| <i>E. canis</i> | | + | + | | | + | + | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | D | + | + | |
| <i>E. moraviensis</i> | + | + | + | + | - | + | D | - | - | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | + | |

LAP: lösin aminopeptidaz; PYR: pirolidonil arilamidaz; ADH: arginin dihidrolaz; HIP: hipurat hidrolizi; GLU: glukoz; MNTL: mannitol; SORB:sorboz; ARB: arabinoz; SBTL:sorbitol; RAF: raffinoz; SUK: sukroz; PRV: piruvat; MPG: metil-alfa-D-glukopirazonit; D: değişken

mikroorganizmanın virulansından sorumlu tek faktör değildir. Birçok çalışma ile mikroorganizmaya ait farklı virulans faktörleri bulunmuştur (26).

Enterokok bakteriyemilerinde genel olarak %42-68 oranında mortalite bildirilmektedir. Ancak bu hastaların birçoğunun ileri derecede düşük olması ve polimikrobiyal bakteriyemisi bulunması nedeniyle, enterokokların mortalitedeki rollerinin tam olarak tespit edilmesini olanaksız kılmaktadır (27).

6.1. Sitolizin: Daha önce hemolizin olarak tanımlanan sitolizin, *E. faecalis* izolatlarında %60'a varan sıklıkta saptanabilen bir virülans faktörüdür. Hemolitik özellik taşımaktadır. İnsan, at ve tavşan eritrositlerine karşı litik aktivite gösteren bir sitotoksik proteindir. Sitolizin eritrositler dışında, polimorfonükleer lökosit (PMNL)'ler, makrofajlar ve Gram pozitif organizmalar içinde litik aktivite gösterir. Buna karşılık toksinin koyun eritrositleri ve Gram negatif bakterilere karşı inaktif olduğu gösterilmiştir. Bu özellik klinik laboratuvarlarda tanısal açıdan önemlidir. Sitolizin, litik aktivitesine ek olarak aynı zamanda bir bakteriosin özelliği gösterir ve bütün Gram pozitif organizmalar için bakterisidal etkilidir. Sitolizin kodlayan gen bölgesi plazmid üzerinde ya da bakteriyel kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir (15, 26). İnsanlarda patojen olan enterokok suşlarında sitolizin üretiminin, non patojen suşlardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (28).

6.2. Agregasyon faktörü: Bakteri yüzeyinde bulunan, saç benzeri, protein yapıda bir adhesin molekülüdür. Birçok özelliği ile bakterinin virülansına katkıda bulunmaktadır. Hücre-hücre temasına katkıda bulunarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda hücre dışı matriks proteinlerine adhezyonla konak hücreye yapışma ve hücre yüzey hidrofobitesini artırma gibi özellikleri ile virulansa katkıda bulunmaktadır. Agregasyon faktörü enterokoklara kalp kapaklarına ve böbrek epitel hücrelerine bağlanarak, endokardit ve üriner sistem enfeksiyonu oluşturma yeteneğini kazandırmaktadır. Özellikle kateter enfeksiyonlarında, *E. faecalis* izolasyonu *E. faecium*'a göre daha fazladır. *E. faecalis* suşlarına katetere tutunma yeteneğini agregasyon faktörü sağlamaktadır (26, 29). Nötrofil ve makrofajlarla oluşan cevap değişkenlik göstermekle birlikte konak defansına karşı koruyucu faktör olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Agregasyon

faktörüne sahip olan enterokoklar, kompleman reseptörü yoluyla, opsonizasyondan bağımsız olarak nötrofillere bağlanırlar. Bu bağlanma sonucunda nötrofiller tarafından bakterinin öldürülmesi engellenmiş olur. Makrofajlardaki reaktif oksijen radikalleri ile olan oksidatif patlamayı inhibe ederek, fagositik yıkıma karşı direnç gösterilmesine katkıda bulunur (15, 26). Süperantijen aktivitesi gösteren agregasyon faktörünün T hücre proliferasyonu, proliferen T hücrelerden TNF- β ve IFN- γ salınımı ve makrofajlardan da TNF- α salınımını indüklediği gösterilmiştir (30).

6.3. Jelatinaz: Jelatin, kollajen, fibrinojen, hemoglobin, insülin ve bazı bioaktif peptitleri hidrolize edebilen, matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinden çinko içeren bir enzimdir. Jelatinaz üreten *E. faecalis* suşlarının hayvan modellerinde endokardit oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Jelatinaz ayrıca inflamatuvar hücreler, epitelyal hücreler, fibroblast ve osteoklast gibi hücreler tarafından da üretilerek ekstra selüler matriksi degrade etmektedir (30). *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretimini “*fsr*” gen lokusu regüle eder. Genel olarak tüm izolatlarda yaklaşık % 45-68’inde “*fsr*” gen bölgesi gösterilmiştir. Ayrıca bir çalışmada bu gen bölgesi, endokardit izolatlarının %100’ünde, dışkı izolatlarının ise %53 ünde tespit edilmiştir (26, 30). Yapılan çalışmalarda jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşlarının jelatinaz üretmeyen suşlara oranla akut toksik etkilerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (15).

6.4. Ekstraselüler yüzey proteini: Yüksek moleküler ağırlığa sahip kompleks bir yüzey proteindir. İlk kez *E. faecalis* türlerinde tanımlanmıştır. Karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı sağlar (15). Bu protein “*esp*” geninde kodlanır ve konjugasyonla enterokok izolatları arasında aktarılabilir. *E. faecalis* ve *E. faecium*’un salgın suşlarında bulunduğu için epidemik suşları gösteren bir marker olduğu düşünülmektedir (31, 32). Özellikle bakteriyemi ve endokardit ile ilişkili suşlarda yüksek oranda bulunur. Dışkı kökenli izolatlarında nadiren bulunur. Karboksi-terminal ucu ile üriner sistem enfeksiyonlarında musin veya üroplakin gibi mesane duvarı komponentlerine bağlanmaktadır. Bu sayede *E. faecalis*’in mesane epiteline yapışmasını kolaylaştırdığı ve biyofilm oluşumuna sebep olduğu gösterilmiştir. Proteinin iç

kısımında tekrarlayan ünitelerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalabilme özelliği kazandıran bölge bulunmaktadır. Bu proteinin bakterinin immün yanıtı kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (26, 30, 33).

6.5. Kapsüler polisakkarid antijenleri: Enterokoklarda hücre duvarı, beta-D glukoz-1-fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. *E. faecalis* izolatlarında yaygın olarak üretilen kapsül polisakkaritini kodlayan bir operon bulunurken, hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* izolatlarında ikinci bir kapsül polisakkariti daha tanımlanmıştır. Bu polisakkaritlere karşı oluşan antikorlar koruyucudur. Oponik antikorlar için hedef olan bu polisakkaritler enterokokların virülansına katkıda bulunur. Bununla birlikte enfeksiyonlara karşı immünitede rol oynarlar ve aşı çalışmalarında araştırılmaktadır (15, 26).

6.6. Ekstraselüler süperoksit: *E. faecalis* izolatlarının büyük çoğunluğu ve bazı *E. faecium* türleri tarafından sentezlenmektedir. Süperoksit üretiminin bakterinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (15). Bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik enterokok izolatlarının dışkı kökenli izolatlardan daha yüksek oranda süperoksit radikali ürettiği gösterilmiştir (26, 29, 30).

6.7. Lipoteikoik asit-LTA: Poligliserol fosfat omurgasına glikolipit rezidülerin kovalent bağlarla bağlanması sonucu oluşan bir moleküldür. Lipit parçası; trombosit, eritrosit, lenfosit, PMNL ve epitel hücresi gibi pek çok hücreye bağlanabilmektedir. *E. faecalis* izolatlarında adhezif özelliği gösterilen lipoteikoik asit, donor hücre tarafından üretilen agregasyon faktörü için alıcı hücrede reseptör fonksiyonu görür. Bu nedenle plazmid transferi ve agregat oluşumunu kolaylaştırdığı ve bakteri virülansına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (30, 34).

6.8. Hyaluronidaz: Hyaluronik asidi tahrip ederek doku hasarına yol açan bir enzimdir. Bağ dokusundaki mukopolisakkaritleri depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Hyaluronik asidin yıkım ürünü olan disakkaritler ise bakteriler için besin kaynağı olabilir. Hyaluronidaz kendi yıkıcı etkilerinin yanında diğer bakteriyel toksinlerin zararlı etkilerini de kolaylaştırabilir ve doku hasarının şiddetini artırır. Diş çürümelerindeki doku hasarında rol oynar.

Böylece enterokokların diş kökü kanalından periapikal lezyonlara geçişini kolaylaştırmaktadır (18, 30).

6.9. Feromonlar: *E. faecalis* suşlarında bulunan, 7-8 amino asit uzunluğunda, küçük, hidrofobik peptitlerdir. Suşlar arasında plazmid DNA'sının konjugatif transferini kolaylaştırırlar. Antibiyotik direnci ve sitolizin gibi virulans faktörleri, feromon sistemi ile *E. faecalis* suşları arasında yayılabilir. Ayrıca bazı feromonlar nötrofiller için kemotaktik özellikte oldukları için süper oksit üretimini ve lizozomal enzim sekresyonunu indükleyerek doku hasarı oluşturur (30, 35).

6.10. Antibiyotik direnci: Nozokomiyal enterokok enfeksiyonlarında, öncelikle hastanın hastaneye yatışından sonra intestinal florada bulunan, antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virülans özelliklerine sahip suşlar, antibiyotik kullanımı sonucu duyarlı suşların ortadan kalkmaları ile birlikte sayıca artmakta ve intestinal florada baskın hale gelmektedir. Sonraki aşamada, hastaların bir kısmında intestinal floradan kaynaklanan bu suşlar doku invazyonuna neden olmaktadır. Ayrıca bu suşlar çevreye yayılmak sureti ile de duyarlı hastalarda ekzojen kökenli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Virülans faktörleri arasında sayılan antibiyotik direnci, suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler ise doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır (15, 36).

7. Enterokoklarda antimikrobiyal direnç mekanizmaları

Enterokoklar, son yıllarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak daha sık karşılaşılan ve antimikrobiyal ajanlara direnç oranlarında önemli bir artış görülen bakterilerdir. Dirençli enterokoklar antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı ortamlarda hızla yayılabilirler. Bu sebeple enterokok enfeksiyonlarının tedavisi klinikte karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir (37, 38). Enterokoklarda antibiyotiklere direncin mekanizması iki ana grupta incelenebilir (Tablo-4) (39).

Tablo-4: Enterokoklarda antimikrobiyal direnç.

| 1- İnterensek (doğal-kromozomal) direnç | 2- Eksterensek (kazanılmış) direnç |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">➤ Aminoglikozid direnci (düşük düzeyde direnç)➤ β - laktamlar (yüksek MİK değerleri)➤ Linkozamidler (düşük düzeyde direnç)➤ Trimetoprim-sulfametoksazol (sadece in vivo direnç)➤ Kinupristin/dalfopristin (<i>E. faecalis</i>) | <ul style="list-style-type: none">➤ Aminoglikozid direnci (yüksek düzeyde direnç)➤ β-laktamlar (PBP' lerde değişiklik)➤ Hücre duvarına etkili ajanlar (tolerans)➤ Florokinolonlar➤ Linkozamidler (yüksek düzeyde direnç)➤ Makrolidler➤ Penisilin ve ampisilin (β-laktamaz)➤ Rifampisin➤ Tetrasiklin➤ Vankomisin➤ Kinupristin/Dalfopristin➤ Linezolid |

7.1. İnterensek (doğal-kromozomal) direnç

İnterensek direnç enterokok türlerinin tümünde bulunan kromozomal dirençtir. Enterokok türleri penisilinlere, sefalosporinlere, linkozamidlere, trimetoprim-sulfametaksazol (TMP-SMX)'e, aminoglikozidlere (düşük düzeyde), polimiksinlere, monobaktamlara ve kinopristin/dalfopristin'e karşı kalıtsal olarak dirençlidir (4, 40).

7.1.1. β -Laktam direnci

Enterokoklardaki intrensek penisilin direnci β -laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren penisilin bağlayan protein 5 (PBP5) enziminin varlığına bağlıdır. Enterokoklar PBP5 enzim afinitesinde azalma sonucunda penisiline düşük düzeyde intrensek direnç gösterir. *E. faecalis* suşlarında penisilin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri streptokoklardan 10-100 kat daha yüksektir. *E. faecium* suşlarında penisilin direnci *E. faecalis*'e oranla daha yüksektir. *E. faecium* PBP'lerin penisiline afinitesi son yıllarda belirgin azalmıştır. Bunun sonucunda *E. faecium* suşlarının %85–90'ı ampisiline dirençli duruma gelmiştir. *E. faecalis* suşlarında ise ampisilin direnci %2–3 civarındadır (41, 42). *E. faecalis*

izolatlarının çoğu 1–8 µg/ml penisilin veya ampisilin konsantrasyonları ile inhibe olurken, *E. faecium*'da ortalama 16-64 µg/ml konsantrasyon gereklidir. Bununla birlikte bazı izolatlar daha dirençlidir (43).

Fontana ve ark. (44) tarafından yapılan bir çalışmada *E. faecium*'un PBP5 üretme yeteneğini kaybetmesi ile yüksek penisilin dirençli bir suşun, penisiline aşırı duyarlı hale geldiği gösterilmiştir.

7.1.2. Aminoglikozid direnci

Enterokoklar aminoglikozidlere düşük düzeyde intrinsek dirençlidir. Bu direnç, hücre duvarından geçebilme yeteneği ile ilgili olup bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanır. Aminoglikozid grubu ilaçlar, hücre duvarı sentezini engelleyen β-laktam gibi antibiyotikler ile kombine edilirse zedelene hücre duvarından daha kolay geçerken, oluşacak sinerjistik etki ile MİK değerleri önemli ölçüde düşecektir (40, 41, 42).

7.1.3. Trimetoprim–Sulfametoksazol direnci

Enterokokların eksojen kaynaklı folik asiti kullanma yetenekleri olduğundan TMP-SMX'e intrinsek olarak dirençlidirler. Çoğu enterokok suşu TMP-SMX'e in-vitro duyarlı görülse de, in-vivo şartlarda etkisiz olduklarından antibiyotik duyarlılık testlerinde TMP-SMX kullanılmamalıdır (40).

7.1.4. Diğer antibiyotikler

Enterokoklar linkozamid ve klindamisine karşı düşük düzeyde intrinsek direnç gösterirler. *E. faecalis* intrinsek olarak quinupristin/dalfopristine dirençlidir. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* vankomisine düşük düzeyde intrinsek direnç gösterir (4, 40).

7.2. Eksterensek (kazanılmış) direnç

Enterokoklarda, çoğu antibiyotiğe karşı kazanılmış direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Bu direnç tipi genellikle DNA mutasyonu veya yeni bir DNA segmentinin transferi sonucu gelişir. Oluşan dirençli genler enterokoklar arasında veya başka mikroorganizmalara transfer edilebilir. Enterokoklarda DNA segmenti transferinden en sık sorumlu olan mekanizma konjugasyondur (4, 40).

7.2.1. β -laktam direnci

β -laktam antibiyotik direnci enterokokların tipik özelliğidir. Enterokoklarda β -laktam antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç iki ayrı mekanizma ile açıklanmaktadır. Birinci mekanizma, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artmasıyla penisilin hücre içine girişinin azalmasıdır. Penisilin direnci, PBP5 miktarı ile doğru orantılıdır ve sıklıkla *E. faecium* suşlarında görülür (4, 42).

β -laktam grubu antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç mekanizmalarının ikincisi ise β -laktamaz üretimidir. β -laktamaz üretimi ilk olarak 1981 yılında Murray ve arkadaşları tarafından ABD'de tanımlanmıştır. β -laktamaz üretimi enterokoklarda nadiren görülen bir özelliktir. Daha çok *E. faecalis* suşlarında görülmekle birlikte *E. faecium* suşlarında da gösterilmiştir. β -laktamaz üreten enterokok suşlarının çoğunda yüksek düzeyde gentamisin direnci de tespit edilmiştir (45, 46).

Enterokoklarda β -laktamaz enzimini kodlayan gen, transfer edilebilen bir plazmid üzerindedir. Yapılan araştırmalarda β -laktamaz ve aminoglikozidleri inaktive eden enzimleri kodlayan genlerin, aynı plazmidde bulunduğu gösterilmiştir (47).

Enterokoklardaki β -laktamazlar penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri hidrolize eder. Ancak penisilinaza dirençli penisilinleri, sefalosporinleri ve imipenemi etkilemez. Stafilokoklardaki β -laktamaz üretimi indüklenebilirken, enterokoklarda farklı olarak konstitüf, düşük seviyede ve inokülüm bağımlıdır (4, 41, 42).

İzole edilen enterokokların tama yakını, β -laktamlara, vankomisin ve teikoplanin dahil hücre duvarına etkili ajanlara karşı tolerandır. Kısa süreli maruziyet sonucu hızla tolerans gelişmektedir. Bu nedenle bu ajanlar enterokoklara karşı bakteriyostatik etkilidir. Üriner sistem enfeksiyonları gibi bazı enfeksiyonlarda bu antibiyotikler tek başına kullanılabilir. Ancak menenjit, endokardit gibi bakterisidal aktivitenin gerektiği enfeksiyonlarda kombinasyon tedavisi kullanmak gerekir. Bu antibiyotiklerin aminoglikozidlerle kombinasyonu sinerjistik bakterisidal etki göstermektedir (25).

7.2.2. Aminoglikozid direnci

Enterokoklarda ılımlı seviyede aminoglikozid direnci (MİK=62-500 µg/ml) genellikle düşük permeabiliteden dolayı gelişir. Aminoglikozidlerle β-laktam grubu antibiyotikler kombine edilerek bu tip direnç aşılabilir. Enterokoklar, aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde direnç (MİK>2000 µg/ml) kazanabilirler. Bu tür bakterilerde aminoglikozidler ile duvar sentezini inhibe eden bir antibiyotiğin kombinasyonu sonucu elde edilen sinerjistik etki kaybolmuştur. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci iki farklı mekanizma ile meydana gelebilir:

a) Ribozomal direnç: Ribozomlardaki bağlanma bölgesinin değişmesi sonucu oluşur. Yalnızca streptomisine karşı gelişen dirençten sorumludur. Transfer edilemez ve nadir görülen bir direnç türüdür.

b) Aminoglikozidleri inaktive eden enzimlerin sentezi: Duyarlı suşlara transfer edilebilir. Bu nedenle hızla yayılır ve en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Bu enzimler ile ilişkili genler plazmid veya transpozonda yerleşmiştir (41).

Enterokoklarda gentamisin ve streptomisine karşı gelişen direnç farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Bu nedenle iki ajanın da duyarlılık testlerinde kullanılması önemlidir. Gentamisine yüksek düzeyde dirençten sorumlu olan enzim bir füzyon proteindir. İki aktif bölgesi vardır ve hem 6'-asetiltransferaz hem de 2"- fosfotransferaz aktivitesine sahiptir. Bu nedenle streptomisin dışındaki tüm aminoglikozidlerin sinerjistik etkisini ortadan kaldırır. Bu enzimler genellikle konjugatif plazmidler tarafından kodlanır. Gentamisine yüksek düzeyde direnç gösteren bir suş, streptomisin dışında tüm aminoglikozidlere yüksek düzeyde dirençli kabul edilir (38, 48, 49).

7.2.3. Kloramfenikol direnci

Yapılan çeşitli çalışmalarda enterokokların %20–42'sinin kloramfenikole dirençli olduğu tespit edilmiştir. Dirençten en sık sorumlu mekanizma, plazmid üzerinde "cat" geni ile kodlanan kloramfenikol asetil transferaz üretimidir. Efluks mekanizması da dirençte rol alabilen bir diğer mekanizmadır (40).

7.2.4. Tetrasiklin direnci

Enterokoklarda tetrasiklin grubu antibiyotiklere dirençten sorumlu *tetM*, *tetQ*, *tetN* ve *tetL* gibi çok sayıda gen tanımlanmıştır. *tetM* geni Tn916 transpozonu üzerinde taşınır. *tetO* ve *tetN* genleri tetrasiklinlerin ribozomlar üzerindeki etkisini inhibe ettiği düşünülmektedir. *tetL* geni ise bir plazmid üzerinde taşınır ve mikroorganizma tetrasiklinle karşılaştığında amplifiye olarak tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan aktif transport sistemini kodlar. Enterokoklardaki tetrasiklin direnci konjugasyon yolu ile kazanılan direncin tipik örneğidir (21, 40, 41).

7.2.5. Kinolon direnci

Enterokoklarda kinolon direnci *gyrA* (giraz) ve *parC* (topoizomeraz) genlerindeki mutasyonlara bağlı olarak gelişir (40).

7.2.6. Eritromisin direnci

Enterokoklarda çok sık görülen bir direnç türüdür ve genellikle rRNA'nın metilasyonundan sorumlu *ermB* geni ile ilişkilidir. Metilasyon nedeniyle eritromisin ribozomlara bağlanamaz. Aynı mekanizma, klindamisine yüksek düzeyde dirençten de sorumludur. *ermB* geni, Tn917 transpozonunun bir parçası olarak çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilir. Yine asetil transferaz veya efluks mekanizması sonucu da oluşabilir (21, 40).

7.2.7. Oksazolidinon direnci

Enterokoklarda çoklu ilaca dirençli suşlarla oluşan enfeksiyonlarda oksazolidinon grubu bir antibiyotik olan linezolid iyi bir seçenektir ve sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak ilk olarak 2002 yılında linezolid dirençli suşlar bildirilmiştir. Linezolid direncinden 23S rRNA V domainindeki mutasyonlar (G-2576-T) sorumlu tutulmaktadır (40, 50, 51).

7.2.8. Glikopeptit direnci

Enterokok türleri ile oluşan enfeksiyonlarında glikopeptitler sıklıkla kullanılmaktadır. Enterokoklarda normal şartlarda peptidoglikan tabakasının sentezinde, iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanarak "D-Ala-D-Ala" yı oluşturur. Oluşan D-Ala-D-Ala, UDP-N-asetil muramil tripeptidine eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptit meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana transglikozilasyon yoluyla bağlanır ve

gücüne katkıda bulunur. Vankomisin ve teikoplanin, bu pentapeptidin D-Ala-D-Ala terminaline yüksek bir afiniteyle bağlanır. Peptidoglikan sentezinin transglikozilasyon aşamasını inhibe eder ve bu prekürsörler hücre duvarı sentezinde kullanılamaz.

Enterokoklarda glikopeptid direncinin temeli peptidoglikan zincirinde D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Laktat veya D-Ala-D-Serin'in ligaz enzimi ile sentezlenmesidir. Vankomisin ve teikoplanin bu yeni terminale yüksek afiniteyle bağlanamaz ve duvar sentezini inhibe edemez. Hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuçta glikopeptitlere karşı direnç gelişir. Önceleri bu direncin sınıflandırılması MİK değerleri baz alınarak, fenotipik olarak yapılmıştır. Günümüzde ise sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre, genotipik olarak yapılmaktadır. D-Ala-D-Laktat *VanA*, *VanB*, *VanD* ve *VanG* tipi dirençte sentezlenirken, D-Ala-D-Serin ise *VanC* ve *VanE* tipi dirençte sentezlenmektedir (4, 41, 52).

7.2.8.1. Fenotipik direnç

Fenotipik vankomisin direnci, 6 farklı tipte (*VanA*, *VanB*, *Van C*, *Van D*, *Van E* ve *Van G*) oluşabilir. *VanA* ve *VanB* ilk olarak *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında tanımlanmıştır. Bu direnç fenotipleri enterokoklarda önceden bulunmayan, yeni kazanılmış gen dizilerinden kaynaklanır (4, 41).

Fenotipik *VanA* tipi direnç, glikopeptit ve nonglikopeptit ajanlarla indüklenebilir. Yüksek düzeyde vankomisin (MİK \geq 64 μ g/ml) ve teikoplanin direnci (MİK \geq 16 μ g/ml) görülür. *VanA* direnç determinantları, tüm enterokok suşları arasında transfer edilebilir (4, 41, 53).

Fenotipik *VanB* tipi dirençte daha ılımlı seviyede indüklenebilir vankomisin direnci [MİK \geq 32-64 μ g/ml (4-1000 μ g/ml)] görülürken teikoplanine duyarlıdır. *VanB* sadece *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında tanımlanmıştır (4, 41).

Fenotipik *VanC* tipi direnç ise *E. casseliflavus* ve *E. gallinorum* suşlarında tanımlanmıştır. İntrensik düşük seviyede vankomisin direnci (MİK \geq 4-32 μ g/ml) görülürken teikoplanine duyarlıdır (Tablo-5) (4, 41, 53).

Enterokoklarda fenotipik sınıflandırmanın bazı dezavantajları vardır. Örneğin *VanA* fenotipinin genetik göstergeleri *E. gallinorum* ve diğer

enterokoklarda görülmektedir (54). Yine *VanA* tipi direnç gösteren bir *E. avium* suşunda, tipik teikoplanin direnci olmasına rağmen vankomisine daha düşük düzeyde direnç ($MİK \geq 16 \mu\text{g/ml}$) tespit edilmiştir. Ayrıca mutant *VanB* suşlarında teikoplanin direnci görülebilir. Bu nedenle mutant *VanB* suşları fenotipik olarak *VanA* suşlarından ayırt edilememektedir. Bu tür dezavantajlara rağmen fenotipik sınıflandırma, laboratuvarlarda kolay kullanımı, düşük maliyeti ve genotipik sınıflandırma ile uyumlu olması nedeniyle halen kullanılmaktadır (4).

Tablo-5: Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri

| | Peptidoglikan Prekürsör | Direnç geninin kaynağı | Ligaz geni | Vankomisin MİK ($\mu\text{g/ml}$) | Teikoplanin MİK ($\mu\text{g/ml}$) | Transfer edilebilme | Bulunduğu türler |
|-------------|-------------------------|------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|--|
| VanA | D-Ala-D-Laktat | Kazanılmış | <i>vanA</i> | 64-1000 | 16-512 | Evet | <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinorum</i> <i>E. durans</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. avium</i> |
| VanB | D-Ala-D-Laktat | Kazanılmış | <i>vanB</i> | 4- 1000 | 0,5-32 | Evet | <i>E. faecalis</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinorum</i> <i>E. faecium</i> |
| VanC | D-Ala-D-Serin | Yapısal | <i>vanC1</i> <i>vanC2</i> <i>vanC3</i> | 2-32 | 0,5-1 | Hayır | <i>E. gallinorum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i> |
| VanD | D-Ala-D-Laktat | Kazanılmış | <i>vanD</i> | 64-256 | 4-32 | Hayır | <i>E. faecium</i> |
| VanE | D-Ala-D-Serin | Kazanılmış | <i>vanE</i> | 16 | 0,5 | Hayır | <i>E. faecalis</i> |
| VanG | D-Ala-D-Laktat | Kazanılmış | <i>vanG</i> | 16 | 0,5 | Hayır | <i>E. faecalis</i> |

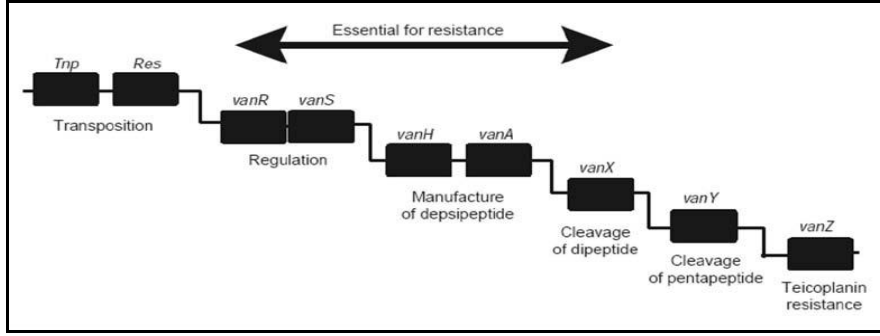
7.2.8.2. Genotipik direnç

7.2.8.2.1. *VanA* tipi direnç: Tüm glikopeptid direnç tipleri arasında en ayrıntılı olarak incelenen ve en sık karşılaşılan direnç türüdür. Hem vankomisine ($MİK \geq 64 \mu\text{g/ml}$) hem de teikoplanine ($MİK \geq 16 \mu\text{g/ml}$) yüksek düzeyde direnç sözkonusudur. *VanA* gen kümesinin hem transfer edilebilen hem de transfer edilemeyen plazmidler ve bakteriyel kromozomlar üzerinde bulunabildiği bildirilmiştir. *VanA* direncinden sorumlu esas yapı *Tn1546* transpozonu ve bu transpozonla ilişkili elemanlar üzerinde taşınan *VanA* gen

kümesidir. *Tn1546* transpozonu 9 ayrı gen içermektedir (Şekil-2). Bu genlerden *Tnp* ve *Res*, *Tn1546*'nın transpozisyonundan sorumludur. Diğer genler olan *VanR*, *VanS*, *VanH*, *VanA*, *VanX*, *VanY* ve *VanZ* ise glikopeptid direncinden sorumludur. Bu genler *E. faecium*'da sıklıkla bir plazmid üzerinde bulunan *Tn1546*'da yerleşmektedir. Bu genlerin ekspresyonu sonucu, peptidoglikan prekürsörlerin terminalinde D-Ala-D-Ala yerine D-Ala-D-Laktat sentezlenmekte ve vankomisin bu bileşiğe daha düşük affinite ile bağlanmaktadır (4, 52, 53).

VanR ve *VanS* proteinleri iki komponentli bir regülatör sistem oluşturur. Bu sistem *VanH*, *VanA* ve *VanX* gen kümesinin transkripsiyonunu düzenler. Bu düzenlemede *VanS*, sensör gendir. Glikopeptitlerin ortamdaki varlığını algılayarak *VanS* proteinini kodlar ve sinyal iletimini sağlar. *VanR* ise regülatör gendir ve diğer direnç genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunda görev alan *VanR* proteini kodlar. *VanS*, *VanR* ye sinyal verir. Buna bağlı olarak *VanR* hem kendi promoter bölgesini hem de *VanH*, *VanA*, *VanX* gibi dirençte yer alan genlerin promoter bölgesini aktive eder. Bu aktivasyon sonucunda genlerin transkripsiyonu gerçekleşir. *VanA* tipi dirence sahip olan enterokok suşlarında vankomisin ve teikoplanin transkripsiyonu indüklenebilir olmakla birlikte kesin sinyaller halen bilinmemektedir.

VanA'nın kodladığı bir ligaz proteini D-Ala-D-laktat oluşumunu sağlar. *VanA* tek başına vankomisin direncini sağlayamaz. Enterokoklar, D-laktat sentezlemek için *VanA* için substrat üretiminde gerekli olan *vanA* operonu içindeki genleri kazanmalıdır. *VanH*, piruvattan D-Laktat sentezini sağlayan bir dehidrogenaz enzimini kodlayarak D-laktat havuzunun oluşumunu sağlar. *VanX*, bir D,D-dipeptidaz enzimi olan *VanX* proteinini kodlar. Ortamda bulunan D-Ala-D-Ala'nın doğal bir ligaz yardımıyla hidrolizinden sorumludur. D-Ala-D-Laktata karşı aktivite göstermez. *VanY*, D,D-karboksipeptidaz olan *VanY* proteini kodlar. Peptidin sonundaki D-Ala'yı ayırarak pentapeptit sentezini azaltır ve ılımlı seviyede direnç sağlar. *VanZ*, teikoplanin MİK değerini ılımlı düzeyde artırır ama vankomisin MİK değerini arttırmaz. *VanY* ve *VanZ* dirence katkıda bulunabilir ama direnç için zorunlu değildir (4, 52).



Şekil-2: *VanA* operonunun yapısı.

VanA geni ilk olarak *E. faecium*'da, daha sonra başta *E. faecalis* olmak üzere, *E. durans*, *E. gallinorum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus* ve *E. raffinosus* gibi diğer enterokok türlerinde belirlenmiştir (55, 56).

Avrupa'da en çok *VanA* tipi direnç görülmektedir. ABD'de de *VanB* suşları yaygın olmasına rağmen halen *VanA* daha baskın direnç tipidir. *VanA* ligaz geni enterokok türlerinin büyük kısmında bulunmakla birlikte *Corynebacterium* spp, *Arcanobacterium haemolyticum* ve *Lactococcus* spp gibi enterokok dışı türlerde de bulunmaktadır (4, 52, 53).

7.2.8.2.2. Van B tipi direnç: Enterokoklarda *VanB* tipi glikopeptid direnci *VanA* ligaza yapısal olarak benzerlik gösteren *VanB* ligaz ile oluşur. *VanB* proteini D-Ala-D-Laktat pentapeptidinin oluşumuna yardımcı olur. Kromozomal yerleşimlidir. Ancak *Tn1547* ve *Tn5382* trnspozonu veya plazmid üzerinde de taşınabilir, transfer edilebilir. *VanA* operonunda yer alan *VanZ* dışındaki diğer altı gen *VanB* de bulunmaktadır. Bu genler; *vanH_B*, *vanX_B*, *vanY_B*, *vanR_B* ve *vanS_B* ile gösterilir. Vankomisin direnç düzeyi ise D,D-dipeptidaz (*VanX_B*) aktivitesinin düzeyi ile ilişkilidir (4, 41).

VanB gen kümesinde görevi tam olarak anlaşılamayan *VanW* geni mevcuttur. *VanR_B* - *VanS_B* sistemi vankomisin tarafından indüklenirken teikoplanin tarafından indüklenmez. *VanB* tipi dirençte vankomisine değişken düzeyde direnç (MİK=4-1000 µg/ml) görülür. Bu suşlar teikoplanine duyarlıdır. Ancak vankomisin tarafından indüklenmiş suşlarda teikoplanine de direnç geliştiği bildirilmiştir. Bu suşlarda glikopeptid tedavisi altında teikoplanin direnci geliştiği de gösterilmiştir.

VanB tipi direnç esas *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında tanımlanmış olmakla birlikte nadir olarak *E. casseliflavus*, *E. gallinorum* ve enterokok dışı bazı türlerde de bildirilmiştir (4, 55, 56).

7.2.8.2.3. *VanC* tipi direnç: *E. gallinorum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* suşlarında görülen intrinsek bir direnç türüdür. *VanC* geni bu suşlarda hemen her zaman bulunur. *VanC* tipi direnç yapısaldır, indüklenemez ve transfer edilemez. *VanC-1*, *VanC-2* ve *VanC-3* olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. *VanC-1* *E. gallinorum*'da, *VanC-2* *E. casseliflavus*'ta, *VanC-3* ise *E. flavescens*'te daha sık görülür. *E. casseliflavus/VanC-2* ile *E. flavescens/VanC-3*'ün %98 oranında benzer olduğu gösterilmiş ve yüksek olasılıkla aynı türü temsil ettiği kabul edilmektedir. *VanC* tipi dirençte vankomisine düşük düzeyde direnç (MİK=8-16 µg/ml) varken, teikoplanine duyarlıdır.

E. gallinorum'un *VanC* ligazı, D-Ala-D-Ala yerine, D-Ala-D-serin ile sonlanan pentapeptid oluşumunu sağlar. D-Alanin yerine D-serin geçişi, vankomisine affiniteyi azaltır. Oluşan peptidoglikan yapısındaki D-Alanin ile D-Serin oranı, *VanC* taşıyan VRE suşları arasındaki vankomisin direnç farklılığına yol açar. D-Ala-D-Alanin oranının yüksek olması düşük MİK değerlerini, D-Ala-D-Serin oranının yüksek olması ise yüksek MİK değerini açıklayabilir (4, 40, 53-56).

7.2.8.2.4. *VanD* tipi direnç: Çok az sayıda *E. faecium* suşunda tanımlanmış yeni bir direnç tipidir. *VanD* geni kromozomal yerleşimlidir ve konjugasyonla transfer edilemez. *VanA* ve *VanB* ligaz genlerine %67 oranında benzerlik göstermesine rağmen *VanD* suşlarında D,D-dipeptidaz aktivitesi belirlenememiş, düşük düzeyde karboksipeptidaz aktivitesi tespit edilmiştir. D,D-dipeptidaz aktivitesi bulunmamakla birlikte *VanX_D*, *VanR_D*, *VanS_D*, *VanH_D* genleri, *VanD* gen kümesini oluşturmaktadır. *VanD* direncinde hem vankomisine (MİK=64-256 µg/ml) hem de teikoplanine (MİK=4-32 µg/ml) direnç vardır (4, 40, 57).

7.2.8.2.5. *VanE* tipi direnç: Bu direnç tipi ilk olarak *E. faecalis* BM4405 izolatında tanımlanmıştır. Vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK=16 µg/ml) iken teikoplanine duyarlıdır (MİK=0,5 µg/ml). *VanE* geni

kromozom üzerine lokalizedir ve transfer edilemediği bilinmektedir. Bu direnç türü, *VanC* tipi dirence benzerlik gösterir. Ancak *VanE* tipi direncin genetik belirleyicisi farklıdır ve intrinsek bir direnç tipi değildir (57).

7.2.8.2.6. VanG tipi direnç: Bu direnç tipi ilk olarak *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK=16 µg/ml) iken teikoplanine duyarlıdır (MİK=0,5 µg/ml). Nadiren görülen bir direnç tipidir ve transfer edilemez (57).

7.2.8.2.7. Vankomisine bağımlı enterokoklar (VBE): Bazı *VanA* ve *VanB* tipi VRE suşlarında oluşan vankomisin bağımlılığıdır. Bu enterokoklar üremeleri için vankomisine ihtiyaç duyarlar. Vankomisin tedavisi altındaki hastalardan alınan primer kültürlerde daha çok *VanB* tipi dirence sahip enterokokların ürediği rapor edilmiştir. Bu izolatların subkültürleri yapıldığında üreyememekte ancak vankomisin diski çevresinde veya vankomisin içeren besiyerlerinde üreyebilmektedir. Bu izolatlarda doğal ligaz genlerinde mutasyon sonucu D-Ala-D-Ala'nın normal üretimi olmaz. Vankomisin, D-Ala-D-Laktat oluşumunda rol alan dehidrogenaz (*VanH*) ve ligaz (*VanA* veya *VanB*) sentezini indükler. Oluşan D-Ala-D-Laktat hücre duvarı sentezinde kullanılır. Vankomisin uzaklaştırıldığında D-Ala-D-Laktat daha fazla sentezlenmez. Ortamda D-Ala-D-Ala veya D-Ala-D-Laktat olmadan hücre duvarı sentezi gerçekleşmez. Sonuçta bakteri çoğalmaya devam edemez.

VBE'lerden *E. faecalis* ile *E. faecium* kan, idrar ve dışkıdan izole edilmiştir. Sonraları VBE'ler vücudun çeşitli bölgelerinden izole edilmiştir. İzole edilen hastalarda vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik tedavisi ve daha önce izole edilmiş bir VRE hikayesi mevcuttur. VBE'lerin pulsed field gel elektroforezi (PFGE) ile VRE'ye benzer DNA paternine sahip olduğu gösterilmiştir (4, 58).

8. Enterokok Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Enterokoklar, insan ve hayvan gastrointestinal sisteminin doğal üyesidir. Doğada; toprak, su, bitki, kuşlar, böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada buldukları için, gerek hastane, gerekse hastane dışı ortamda endojen

kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. *E. faecalis* diğer enterokok türlerine göre dışkıda daha yüksek oranda bulunur (15).

Enterokoklar çevre koşullarına oldukça dayanıklı olmaları nedeniyle her çeşit ortamda canlılıklarını sürdürebilirler. Steteskop, kapı tokmağı, yatak, komidin gibi birçok cansız nesne üzerinde uzun süre canlılığını korurlar. Bu nedenle enterokoklar gerek cansız nesnelere aracılığıyla, gerekse sağlık personelinin kontamine olmuş elleriyle hastadan hastaya taşınarak hastane salgınlarına yol açabilmektedir (59).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, enterokokların hastadan hastaya ve hastaneler arası yayılmasında önemli risk faktörü olarak bu bakterilerin normal barsak florasında bulunması gösterilmiştir. Bu çalışmalarda nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan enterokok türleri, sağlık personelinin ellerinden, hastane ve bakım evlerindeki çevresel kaynaklardan izole edilmiştir (60, 61)

Avrupa ülkeleri ve ABD'deki hastanelerde vankomisin'in yaygın olarak kullanılmaya başlanması sonucunda glikopeptidler başta olmak üzere β -laktam ve aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı dirençli çok sayıda klinik izolat ve olgu bildirimi yapılmıştır. Özellikle VR *E. faecium* suşlarının klonal seleksiyona uğrayarak hastane ortamına hakim olduğu, hastane enfeksiyonlarındaki insidansının hızla arttığı tespit edilmiştir (4). Avrupa'da çeşitli hayvan kaynaklarından ve lağımlardan VRE izolasyon sıklığı oldukça yüksektir. Bunun nedeninin bu ülkelerde kullanılan hayvan yemlerine avoparsin (glikopeptit türevi) konması olduğu düşünülmektedir (62, 63). Avrupa Birliği ülkelerinde toplumdaki VRE rezervuarının hastaneler için bir tehdit oluşturabileceği endişesi ile 1997 yılında hayvan yemlerine avoparsin eklenmesi yasaklanmıştır (15).

CDC verilerine göre, 1990 - 1992 yılları arasında hastane enfeksiyonları içerisinde enterokokların yaklaşık %10'luk bir insidans ile üçüncü sıklıkta yer aldığı bildirilmiştir. Bildirimi yapılan bu verilerin farklı hastanelerde yapılan çalışmaların sonuçları olduğu, enterokokların hastane kökenli bakteriyemilerde %9, cerrahi yara enfeksiyonlarında %13, üriner sistem enfeksiyonlarında %12 - 16 gibi bir orana sahip oldukları belirtilmiştir.

Aynı bildiri de bu enfeksiyon etkenlerinden %60'tan fazlasının ekzojen kaynaklı olduğu ve yarısından fazlasının da yoğun bakım ünitelerinde görüldüğü belirtilmiştir (4, 7, 64).

NNIS verilerine göre; 1989 -1997 yılları arasında yoğun bakım ünitelerindeki nozokomiyal enfeksiyonlarda VRE izolasyon oranlarının %0.4'ten %23.2'ye, diğer ünitelerde %0.3'ten %15.4'e yükseldiği bildirilmiştir (65). Yine NNIS verilerine göre 1998 yılında yoğun bakım ünitelerinde görülen hastane enfeksiyonlarındaki VRE insidansı %22,6, 1999 yılında %25 ve 2003 yılında ise %28,5 olarak bildirilmiştir. Bu bildirimler dışında genel olarak ABD'de 2000'li yılların başlarında hastane enfeksiyonlarında VRE insidansının %25'in üzerine çıktığı, hastanede yatan hastalarda VRE kolonizasyon oranının ise %5 - 18 arasında değiştii, ancak hastane dışındaki popülasyonda intestinal kolonizasyon olmadığı bildirilmiştir (66, 67).

European Antimicrobial Surveillance System (EARSS) 1998 verilerine göre bakteriyemiye sebep olan *E. faecium* izolatları arasında en yüksek vankomisin direnç oranı İngiltere'de %24 ve İtalya'da %10 olarak bildirilmiştir. Ancak aynı sistemin 2007 verilerine göre en düşük VRE insidansı İskandinav ülkelerinde %1 olarak verilirken, Yunanistan ve Portekiz gibi ülkelerinde VRE oranının %45'in üzerine çıktığı belirtilmiştir. Almanya'da EARSS verilerine göre 2001 yılında VR *E. faecium*'larda %1 olan bu oran 2007 yılında %15'e çıkmıştır. VR *E. faecalis* oranı ise %1'in altında kalmıştır. Fransa'da 2005 yılında VR *E. faecium* oranı %5 olarak bildirilmiştir. İngiltere'de 2007 yılında enterokokların sebep olduğu bakteriyemilerde VRE oranı %8,5 - 12,5 arasında bulunmuştur. Bu oran *E. faecium* için %20 - 25, *E. faecalis* için %1,6 - 2,5 olarak bildirilmiştir. İrlanda'da 2005 yılında VR *E. faecium* oranı %30 - 35, VR *E. faecalis* oranı ise %5'in altında bildirilmiştir. İtalya'da 1995 yılında VR *E. faecium* oranı %9 iken, 2001 yılında %15'e, 2003 yılında %24'e çıkmış, 2007 yılında ise %11 olarak bildirilmiştir. VR *E. faecalis* oranı ise %5'in altında kalmıştır (9).

Ülkemizde yapılan, yenidoğanlarda fekal VRE taşıyıcılık oranı ve bu taşıyıcılığın hangi faktörle etkilendiğini araştıran, 110 rektal sürüntü örneğinin incelendiği bir çalışmada %7 oranında VRE suşu izole edilmiştir. Bu

çalışmada uzun süreli antibiyotik kullanımı ve düşük doğum ağırlığı en önemli risk faktörleri olarak tespit edilmiştir (68).

Türkiye’de vankomisine dirençli ilk *E. faecium* suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi’nde Vural ve ark.’ları tarafından bildirilmiştir. Bu suş, malign histiyositozis tanısı almış bronkopulmoner enfeksiyonu olan 11 aylık bir çocuktan, 15 gün arayla alınmış iki ayrı plevra sıvısından izole edilmiştir (69). Bunu 1999 yılında İstanbul Üniversitesi ve Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisinden bildirilen suşlar izlemiştir (70). 2003 yılı itibariyle VRE sorunu ile karşılaşan merkez sayısı on’u aşmış, günümüzde bu konuda problem yaşamayan merkez neredeyse hiç kalmamıştır (71). Son zamanlardaki gelişmeler ve veriler enterokoklarda glikopeptid direncinin yakın bir gelecekte ülkemizde de ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkabileceğinin habercisidir. Bu nedenle risk faktörlerinin, direnç saptama/tarama yöntemlerinin, kontrol önlemlerinin iyi bilinmesi ve uygulanması gerekmektedir (15).

9. VRE Kolonizasyonu ve Risk Faktörleri

VRE enfeksiyonu ve kolonizasyonu nozokomiyal enfeksiyon açısından önemli bir sorundur. Hiçbir semptoma yol açmayan kolonizasyon uzun süre devam edebilir. Bu da diğer hastalara ekzojen kökenli VRE geçişi için bir kaynak oluşturabilir. VRE kolonizasyonu için risk faktörlerini araştırmak amacıyla bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda en önemli risk faktörlerinden biri olarak bazı antibiyotiklerin (özellikle vankomisin, 3. kuşak sefalosporinler, anti-anaerob antibiyotikler, kinolonlar) kullanımı olduğu bulunmuştur. Hastanede kalış süresinin uzun olması ekzojen kökenli kolonizasyon için önemli bir risk faktörüdür. Kolonize hastaların çıkartıları ile direkt veya indirekt temas sonucu kolonizasyon riski artar. Yine hastane personelinin kontamine olmuş elleri bir başka risk faktörüdür. Hasta ile direkt veya indirekt ilişkili malzemeler (direkt uygulanan glukometre, termometre, tansiyon aleti, elektrokardiyografik monitor, steteskop gibi noninvaziv aletlerin yanında, telefon, anahtar, kapı, kapı kolu, pencere, yer döşemesi, yatak, çarşaf, karyola demiri ve komidin gibi malzemeler, intravenöz kateterler, fleksible skoplar gibi invaziv araç uygulanan hastalarda) yoluyla temasa bağlı olarak kolonizasyon ve enfeksiyon riski artar. VRE’lerin bu malzemelerin

üzerinde 3-15 gün enfeksiyon yeteneğini sürdürdüğü gösterilmiştir. İshali olan VRE kolonize hasta odasındaki kontaminasyonun daha yoğun olduğu bilinmektedir. Hastalardaki ekzojen kökenli VRE kolonizasyonu, hastaneden çıktıktan sonra da aylarca devam edebilmektedir (4, 72).

Ekzojen temasta VRE ile kolonizasyon sıklığı, maruziyetin süresi, konağın duyarlılığı, maruz kalınan VRE miktarı, bakteri virülansı ve kolonizasyon risk faktörlerinin varlığına bağlı olarak değişir. VRE ile endojen kökenli enfeksiyon gelişimi ise mikroorganizmanın intestinal sistemden translokasyonu sonucu oluşur. Aktif sürveyans kültürleri ile VRE kolonizasyonunun takibi, özellikle birimlerde endojen ve ekzojen kaynaklı enfeksiyonların kontrolünde önemlidir (36, 72).

VRE kolonizasyonunda hastaya ait faktörler de önemlidir. Altta yatan ciddi kronik hastalıkların olması, uzun süreli ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması, solid organ transplantasyonu yapılanlar ve hematoloji hastaları VRE kolonizasyonu için yüksek risk oluştururlar. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, intestinal florada duyarlı bakterilerin yok olmasına ve VRE gibi dirençli bakterilerin seçilerek kolonizasyonuna sebep olur. Yine uzun süreli bakım ünitelerinde kalan kişiler, sağlık çalışanları ve bunların ev halkı da VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için risk gruplarıdır. Cerrahi reeksplorasyon yapılan, hastanede servisler arası transfer edilen, enteral beslenen, sükralfat kullanan, VRE kolonize hastalarla aynı odada takip edilen ve VRE vakasına bakım hizmeti veren bir sağlık personeli tarafından bakım hizmeti alan hastalarda kolonizasyon veya enfeksiyon riski artmıştır. Oral vankomisin kullanımı da VRE kolonizasyonu için diğer bir risk faktörüdür. Bu nedenle antibiyotik ilişkili ishal tedavisinde oral vankomisin tedavisi önerilmemektedir (4, 72).

Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre VRE risk faktörleri aşağıda özetlenmiştir.

a. Demografik risk faktörleri

1. Hastanede veya yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatış
2. VRE ile kolonize ya da enfekte hastanın yakınında bulunma
3. VRE kolonize hastaya bakım veren bir hemşireden bakım alma

4. Hastane içinde bir servisten diğerine transfer edilme
5. VRE ile kontamine olmuş tıbbi aletlere maruz kalma

b. Altta yatan hastalığın ağırlığı ile ilgili risk faktörleri

1. Yüksek APACHE II skoru
2. Böbrek yetmezliği
3. Yakın zamanda ameliyat geçirme
4. *Clostridium difficile*'ye bağlı kolit
5. Hepatobilier hastalık
6. İmmünsüprese veya organ alıcısı olmak
7. Enteral beslenme, sükralfat kullanımı

c. Antimikrobiklerle ilgili risk faktörleri

1. Antibiyotik tedavisinin süresi ve miktarı
2. Kullanılan antibiyotikler (Vankomisin, 3.kusak sefalosporin, antianaerob antibiyotik, kinolon, aztreonam)
3. Operasyon öncesi barsak hazırlığı

10. Enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar

Son yıllarda enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar belirgin şekilde artış göstermiş olup, enterokoklar özellikle hastane enfeksiyonları etkenleri arasında ön sırada yer almaya başlamıştır. Üriner sistem enfeksiyonları enterokokların etken olarak en sık rapor edildiği enfeksiyonlardır. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ında etken *E. faecalis*, %5-10 kadarında etken *E. faecium*'dur. *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. gallinorum*, *E. mundtii*, *E. flavescens*, *E. avium* ve *E. hirae* gibi diğer enterokok türleri hastane enfeksiyonlarda etken olarak nadir izole edilmektedir. Son yıllarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak çoklu ilaca dirençli *E. faecium* suşlarında artış saptanmıştır. *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* ve *E. sulfureus* türleri ile PYR testi negatif olan ve atipik enterokoklar olarak adlandırılan *E. columbae*, *E. cecorum* ve *E. saccharolyticus* türleri henüz insanlardan izole edilmemiştir (73).

1. Üriner sistem enfeksiyonları: Enterokoklar, insanlarda en sık üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur. Bu enfeksiyonların büyük bir kısmı

da hastane kaynaklıdır. Üriner sistemde hastane kökenli VRE'ler, komplike olmayan sistit, pyelonefrit, prostatit ve renal abselere neden olabilir. Üriner kateterizasyon en sık görülen risk faktörüdür. Üriner sistem anomalileri, cerrahi girişim ve antibiyotik kullanımı da diğer risk faktörleri arasında yer almaktadır. (72, 74).

2. İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar: Enterokoklar, barsakta bulunan diğer aerob ve anaerob bakterilerle birlikte polimikrobiyal floranın bir parçasıdır. Bu nedenle bu enfeksiyonlar da genellikle polimikrobiyaldir. İntraabdominal enfeksiyonlar enterokokların ikinci sıklıkta izole edildikleri enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlarda *Escherichia coli* veya *Bacteroides* spp.'ye göre daha az oranda bakteriyemi yaparlar. Enterokokların mikst intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte nefrotik sendrom veya sirozlu hastalarda gelişen spontan bakteriyel peritonit etkeni olarak izole edilebilmektedir. Yine periton dializi uygulanan hastalarda gelişen intraabdominal enfeksiyon veya abselerde tek mikroorganizma olarak izole edilebilmektedir. Salpenjit, endometrit, sezeryan sonrası abse gelişimi gibi pelvik enfeksiyonlara da yol açabilmektedirler (41, 74).

3. Bakteriyemi: Bakteriyemi enterokokların üçüncü sıklıkta neden olduğu enfeksiyonlardır. %78'i nozokomiyaldir. Hastane enfeksiyonları içerisinde giderek artan öneme sahip olan VRE bakteriyemileri, hastane kökenli tüm bakteriyemiler içerisinde Avrupa'da 4. ABD'de ise 3. sıklıkta görülmektedir. Olguların %21-45'i polimikrobiyaldir ve büyük çoğunluğunda üriner veya intravasküler kateter bulunur. İntraabdominal, biliyer, pelvik veya yara enfeksiyonları da kaynak olabilmektedir. Solunum yolu enfeksiyonları ise enterokok bakteriyemilerine nadiren sebep olur. Hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi, cerrahi girişimler, ciddi hastalıklar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, nötropeni ve mukozit enterokok bakteriyemilerinin diğer risk faktörleridir (74, 75). Enterokok bakteriyemiye bağlı, mortaliteyi değerlendirmek zordur. Çünkü hastaların çoğunda altta yatan ciddi bir hastalık vardır. Ancak böyle durumlarda mortalite %50'nin üzerine çıkmaktadır (76).

4. Endokardit: Enterokoklar, bakteriyel endokarditlerin % 5-15'in nedenidir. *S. viridans* ve *S. aureus*'dan sonra bakteriyel endokarditlerde rastlanılan en sık üçüncü önemli etkidir. Endokarditlerde en sık izole edilen enterokok türü *E. faecalis*'tir. Endokardit, altta yatan bir kapak hasarı, prostetik kapak, damar içi ilaç kullanımı gibi predispozan faktörlerin varlığında gelişebileceği gibi, hazırlayıcı bir faktör olmadan da gelişebilir. Hastalık daha çok cerrahi yolla veya çeşitli manipulasyonlarla bakterinin GİS'ten veya çoğunlukla genitoüriner sistemden translokasyonu ile endojen kaynaklı olarak gelişir. Sıklıkla subakut başlangıç göstermekle birlikte, akut olarak da gelişebilir. En sık mitral ve aort kapak tutulmaktadır (74-76).

5. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları: Enterokoklar nadiren sellülit veya derin yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olurlar. Cerrahi yara enfeksiyonları, dekübitis ülserleri ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında diğer bakteriler ile birlikte polimikrobiyal olarak izole edilebilirler. Çok nadir olarak bakteriyemi yapabilirler (74, 76).

6. Menenjit: Neonatal dönem dışında sağlıklı erişkinlerde enterokoklara bağlı menenjit nadirdir. Genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, kafa travması, geçirilmiş beyin ameliyatları veya ventrikülo-peritoneal şant gibi predispozan faktörlerin varlığında ortaya çıkabilir. Ayrıca bakteriyemiler, Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (AİDS) ve akut lösemi gibi immünsüpresyonu olan hastalarda VRE menenjiti görülebilir. Etken sıklıkla *E. faecalis* olmakla birlikte seyrek olarak *E. faecium*'dur (74, 77).

7. Neonatal enfeksiyonlar: Enterokoklar yenidoğan için de önemli bir patojendir. Yenidoğanda sepsis ve menenjit en sık görülen enfeksiyon tipleridir. Suşların %82'si *E. faecalis*, %14'ü *E. faecium* olarak tespit edilmiştir. Bu enfeksiyonların gelişiminde düşük doğum ağırlığı, erken doğum ve bu dönemde yapılan invaziv girişimler, uzun süreli hastanede yatış, sefalosporin kullanımı önemli risk faktörleridir (75).

8. Diğer enfeksiyonlar: Enterokoklar diyabetik hastalarda endoftalmite neden olabilirler. Kronik hastalığı olan ileri yaş kişilerde solunum

sistemi enfeksiyonlarına sebep olabilirken, nadiren periodontitis gibi oral kavite enfeksiyonlarına da yol açabilir (15, 41).

11. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi

İlk seçenek antibiyotiklere karşı değişen düzeyde direnç görülmesi nedeniyle enterokok enfeksiyonlarında tedavi oldukça zor ve karmaşıktır. Üriner sistem enfeksiyonları, peritonit ve yara enfeksiyonlarının çoğu ampisilin, penisilin veya vankomisin gibi bir ilaçla tedavi edilebilir. Ancak endokardit, bakteriyemi ve menenjit gibi ciddi enfeksiyonlar tedavide sorun yaratmaktadır. Bu tür enfeksiyonların tedavisi, enterokokların duyarlı oldukları hücre duvarına etkili bir antibiyotik ile yüksek düzeyde direnç göstermedikleri bir aminoglikozid antibiyotiği içeren bakterisidal kombinasyonlar ile sağlanır. Endokardit tedavisinde günlük gentamisin dozunun iki veya üçe, streptomisin dozunun ise ikiye bölünerek verilmesi önerilmektedir. Penisilin alerjisinde veya penisilin/ampisilin dirençli suşlarla olan enfeksiyonlarda vankomisin ve aminoglikozid kombinasyonu da sinejistik etki sağlar. Ancak, yüksek düzeyde aminoglikozit ve ampisilin direncine ek olarak vankomisin direnci de hızla yayılmaktadır. Başta *E. faecium* enfeksiyonları olmak üzere VRE'ler ile olan enfeksiyonların tedavisi problemlili hale gelmiştir (4).

E. faecalis izolatlarının çoğu ampisiline orta düzeyde duyarlıdır. Bu nedenle bu izolatlarda vankomisin direnci olsa bile tedavileri daha kolaydır. Ancak *E. faecium* izolatları penisilin ve ampisiline daha dirençlidir ve vankomisin direnci de daha sık görülmektedir (4, 72).

Kloramfenikol: Çoklu ilaca dirençli *E. faecium* suşlarında in vitro etkili olsa da, VRE enfeksiyonlarının tedavisinde sınırlı başarı gösterir. VRE enfeksiyonlarının tedavisinde mortalitede azalmaya yol açmadığı bilinmektedir (4).

Seftriakson: Normalde enterokoklara etkisizdir. Glikopeptit direncini indükler. Seftriakson, vankomisin ve gentamisin kombinasyonunun, glikopeptit dirençli *E. faecium*'larda etkin olduğu bildirilmiştir (4).

Siprofloksasin ve diğer kinolonlar: Enterokoklara orta derecede etkili ajanlardır. Üriner enfeksiyonlar dışında kullanımları sınırlıdır. Yeni

florokinolonlar Gram pozitif bakterilere daha yüksek aktivite gösterirler ancak enterokoklara karşı etkinlikleri azdır (4).

Tetrasiklin: Bazı VRE türlerine etkilidir. Tetrasiklin direnci oldukça yüksek oranda görülmektedir. Kombine tedavide doksisiklin ve minosiklin kullanılabilir. Tetrasiklin derivelerinden olan bakteriyostatik etkili Glisilsiklin, çoklu ilaca dirençli enterokoklara çok iyi etkinlik göstermektedir (78).

Fosfomisin: Enterokoklara karşı etkili olmakla birlikte tek başına kullanıldığında hızla direnç gelişir (4).

Nitrofurantoin: Pek çok VRE türüne karşı etkilidir. Üriner sistem enfeksiyonlarında bir seçenek olabilir (72).

Rifampisin: Zayıf bakterisidal etkilidir. Direnç gelişiminden dolayı kullanımı kısıtlıdır (72).

Teikoplanin: Endokardit tedavisinde aminoglikozitlerle kombine kullanılması etkin olabilir (72).

Dalfopristin-quinopristin: Streptogramin grubunda yer alan bir antibiyotiktir. VR *E. faecium* suşlarına bakteriyostatik etki gösterirken, *E. faecalis* suşlarına interensek direnç sebebi ile etkin değildir (72). Hayatı tehdit eden VR *E. faecium* bakteriyemilerinin tedavisinde onay almıştır. Protez kapak endokarditi, ventrikülit, katater ilişkili peritonitlerde etkin bulunmuştur (4).

Daptomisin: Enterokokların bütün türlerinde MİK değeri düşüktür. Tek başına bakterisidal etkilidir. Glikopeptitler ile çapraz direnç görülmez (79).

LY333328 (Oritavansin): Semisentetik bakterisidal etkili bir glikopeptittir. VRE türlerine karşı en etkin ajanlardan biridir. Etki mekanizması tam bilinmemekle birlikte vankomisine benzer olduğu düşünülmektedir. İnsanlarda farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır (80).

Oksazolidinonlar: Yeni sentetik antibiyotiklerden olan Oksazolidinonlar, protein sentezini inhibe ederler. Enterokoklara karşı etkinlikleri çok iyidir. Oksazolidinon grubunda olan Linezolid'in enterokok enfeksiyonlarında kullanımı Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır (72, 81)

12. Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri

Enterokoklar nozokomiyal enfeksiyonların önemli sebeplerinden biridir. Çoklu ilaca dirençli suşlar sıklıkla izole edildiğinden epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç vardır. Enfeksiyon kontrolünde bu suşların tip ve subtiplerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Ayrıca ekzojen yolla oluştuğu düşünülen enterokok enfeksiyonlarının da tiplene çalışmaları gerekmektedir. Çoklu ilaç direnci gösteren enterokokların ve VRE'lerin giderek artış göstermesi, bu suşların yayılması ile oluşan nozokomiyal salgınların araştırılması, günümüzde oldukça ilgi çekmiş ve konuyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Epidemiyolojik incelemelerde kullanılan metotlar, çoklu ilaç direnci gösteren suşların izlenmesinde, salgın araştırmalarında, enterokokların çevre ve konaklardaki yayılımının araştırılmasında kullanılmaktadır.

Enterokok enfeksiyonlarında epidemiyolojik incelemeler önceleri fenotipik özelliklerine göre yapılmaktaydı. Fenotipik yöntemler yararlı bilgiler sağlamakla birlikte yorumlanması güç ve tekrarlanabilirliği düşüktür. Ayrıca zaman alıcı ve suşlar arasında ayırım yapmada yetersiz olmaları nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda moleküler tekniklerin geliştirilmesi ve kullanılmasıyla birlikte fenotipik yöntemlerin kullanımı da daha yararlı bilgiler sağlayabilmektedir (82, 83).

Epidemiyolojik araştırmalarda, plazmid profil analizi ve restriksiyon enzim analizi ilk kullanılan moleküler yöntemlerdir (82). PFGE ile DNA restriksiyon endonükleaz profilinin belirlenmesi, enterokok suşlarının ayırt edilmesinde çok büyük yarar sağlamaktadır. Ayrıca Multilokus Enzim Elektroforezi (MLEE), ribotiplene ve AP-PCR veya REP-PCR gibi PCR'a dayalı tiplendirme metotları da suşlar arasındaki genetik ilişkinin araştırılmasında kullanılmaktadır. PCR ürünlerinin dizilenmesi veya Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) ile incelenmesi de enterokoklardaki spesifik direnç genleri arasındaki farklılıkları göstermede ve izlemede kullanılabilen yöntemlerdir.

Yapılan pek çok araştırmaya göre, genomik DNA'nın Sma1 enzimi ile kesildiği PFGE yöntemi suşların ayırımında belirgin avantajlar sağlayan, oldukça yararlı bir yöntemdir. Günümüzde halen PFGE en yararlı ve en

güvenilir tek tiplendirme metodudur. Enterokok enfeksiyonların epidemiyolojik incelenmesinde “altın standart” olarak kabul edilmektedir (10, 11, 12, 82, 83).

Sonuç olarak enterokoklar için bir çok tiplendirme tekniği vardır. Özellikle genomik polimorfizme dayalı çeşitli tiplendirme yöntemleri kullanılarak suşlar arasında yakın ilişkinin göstergesine olanak sağlanabilir. Epidemiyolojik yorumların aydınlatılmasına yardımcı olmak için, farklı restriksiyon enzimlerinin kullanılması veya ek bir moleküler tiplendirme tekniği ile beraber PFGE kullanımı önerilmektedir. Sonuçların yorumlanmasında genel prensip, PFGE profilindeki bant farklılıklarının incelenmesi temeline dayanır (82, 83).

13. Korunma ve kontrol önlemleri

Enterokok enfeksiyonlarının çoğu endojen kökenlidir ve barsaklardan translokasyon sonucu sistemik enfeksiyonlara dönüşür. Ancak, hastanelerde yatan hastalarda direkt ve indirekt yolla da ekzojen kaynaklı bulaş mümkündür. 1980’li yıllardan sonra hastane enfeksiyonlarında VRE gibi çoklu ilaç direnci gösteren suşlarla oluşan enfeksiyonlar artış trendine girmiştir. Bu nedenle CDC’ye bağlı Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) tarafından VRE yayılımını kontrol altına alabilmek amacı ile hastanelerde alınması gereken tedbirleri içeren bir rehber yayınlamıştır.

HICPAC önerilerine göre alınması gereken izolasyon önlemleri (84).

1. VRE ile enfekte veya kolonize hastaların tek kişilik odalara ya da diğer VRE pozitif hastalar ile aynı odaya yerleştirilmesi
2. VRE pozitif hastaların odalarına girerken steril olmayan temiz eldiven giyilmesi
3. Hasta ile veya hasta odasındaki yüzeylerle temasın fazla olmasının beklendiği durumlarda (hastada idrar veya gaita inkontinansı olması, iloestomi, kolostomi veya açık yara drenajı varlığında) odaya girerken steril olmayan temiz bir önlük giyilmesi önerilmektedir. Bazı merkezlerde bu öneri VRE pozitif her hastanın odasına girerken önlük giyilmesi şeklinde modifiye edilerek uygulanmaktadır.

4. Eldiven ve önlüğün hasta odasını terk etmeden hemen önce çıkarılması ve ellerin antiseptikli bir sabunla ya da su içermeyen antiseptik ajanlarla yıkanması, eldiven ve önlük çıkarılıp eller yıkandıktan sonra odadaki yüzeylerin hiçbirisiyle tekrar temas edilmemesi önerilmektedir.

VRE enfeksiyonunu ve kolonizasyonunu tanımlamak, önlemek ve korunmak için hastanelerde birçok birimin ortak çabası gerekmektedir. Enfeksiyon Kontrol Komitesi, Antibiyotik Kullanımı Kontrol Komitesi, Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon Komitesi, hastane eczanesi, mikrobiyoloji laboratuvarı, klinik bölümler, mutfak, çamaşırhane gibi bir çok noktada bazen ortak, bazen de özel uygulamaları içerecek programlar oluşturulmalıdır. Bu programda, VRE saptansın veya saptanmasın kontrollü vankomisin kullanımı en önemli koşul olmalıdır (70).

Vankomisin kullanılması önerilen durumlar (84).

1. β -laktamlara dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar
2. Penisilin alerjisi olan Gram pozitif bakteri enfeksiyonları
3. Antibiyotik kullanımı sonucu oluşan, metronidazol tedavisine cevap vermeyen ve hayatı tehdit eden enterokolitler
4. Endokardit riski yüksek olan hastaların profilaksisi
5. MRSA veya MRSE oranı yüksek olan hastanelerde uygulanan büyük cerrahi girişimlerden önce profilakside (maksimum iki doz uygulanmalıdır).

Vankomisin kullanılmasının önerilmediği durumlar (84).

1. Rutin cerrahi profilaksi
2. MRSA oranı yüksek olmayan hastanelerde, febril nütropeni hastalarında ampirik tedavi
3. Aynı anda alınmış çift kan kültürünün birinde koagülaz-negatif stafilokok üremesi
4. Ampirik olarak başlanan vankomisin tedavisine, kültürde beta-laktam dirençli mikroorganizma izole edilmemiş olmasına rağmen devam edilmesi
5. Kateter enfeksiyonlarına karşı profilaksi

6. GiS'in selektif dekontaminasyonu
7. MRSA kolonizasyonunun eradikasyonu
8. Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen kolitlerin başlangıç tedavisi
9. Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların rutin profilaksisi
10. Sürekli ayaktan periton diyalizi kullanan hastaların rutin profilaksisi
11. Böbrek yetmezliği olan hastalarda β -laktam antibiyotiklere duyarlı enfeksiyonların tedavisi
12. Vankomisin içeren solüsyonların irrigasyon amacıyla ya da topikal olarak uygulanması.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Bakteriyel İzolatlar

Çalışma için 2001-2009 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen tüm VRE suşları incelendi. 257 farklı hastadan alınan örneklerden, toplam 664 VRE suşu izole edildiği tespit edildi. Her yıl, periyotlar halinde incelenerek izole edilen tüm VRE suşları gözden geçirildi. En fazla kümülasyonun olduğu 5 ayrı üçer aylık dönemden toplam 83 *E. faecium* suşu seçilerek çalışmaya dahil edildi. Daha az suşun izole edildiği, olası epidemi düşündürmeyen diğer dönemlerdeki izolatlar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 11 Ocak 2011 tarihinde 2011-2/35 karar numarası ile alınan onay doğrultusunda yapıldı.

2. Bakteriyolojik çalışma

Tür tayini ve vankomisin direncinin tespiti

Çalışmaya alınan VRE suşlarının izole edildiği örneklerin ekimi, tür düzeyinde identifikasyonu ve glikopeptit direnci laboratuvarında rutin olarak aşağıda tanımlanan işlemler uygulanarak değerlendirildi.

Rutin taramalar sonucu alınan perianal sürüntü örnekleri; 6 µg/ml vankomisin içeren Enterococcosel broth (BD, BBL, Fransa) besiyerlerine ekildi. 72 saat, 45°C'de inkübasyon süresince besiyerinde siyah renk oluşumu gözlenen örneklerden %5 Koyun Kanlı Colombia agar (BD, BBL, Almanya) besiyerine pasaj yapıldı. İkinci ekim hattına vankomisin diski konarak 37°C'de bir gecelik inkübasyon sonucunda oluşan koloniler incelendi. Vankomisin diski etrafında, diske en yakın bölgede üreyen ve enterokok'a benzeyen tek koloni alınıp %5 Koyun Kanlı Colombia Agara (BD, BBL, Almanya) tekrar pasajlandı. Yine ekim hattına vankomisin diski konarak

37°C'de bir gece daha inkübe edildi. Vankomisin diskinde direnci gösteren zon içinde saf halde üreyen enterokok kolonileri Crystal (BD, BBL CRYSTAL™, İrlanda) sistemi ile tür düzeyinde identifiye edildi. Vankomisin ve teikoplanin'in E-test yöntemi ile duyarlılıkları çalışılarak glikopeptitlere olan dirençleri doğrulandı.

Rutin tarama kültürleri dışında laboratuvara gönderilen klinik materyallerin (kan, idrar, yara/pü, santral kateter, periton sıvısı ve boğaz) uygun besiyerinde ekimi sonucu izole edilen ve enterokok olarak düşünülen kolonilerden pasajlar yapılarak saf kültürleri elde edildi. Saf kültürlerin identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testleri için 2001-2003 yılları arasında Sceptor (BD, Sparks MD, USA) sistemi, 2003 yılından itibaren ise Phoenix (BD, Sparks MD, USA) sistemi kullanıldı. Tür düzeyinde tanımlanan ve VRE olarak sonuç veren izolatlar vankomisin ve teikoplanin'in E-test yöntemi ile duyarlılıkları çalışılarak glikopeptitlere olan dirençleri doğrulandı. Çalışmaya alınan 83 VR *E. faecium* suşu, toplam 63 farklı hastadan alınan örneklerden izole edilmişti. Bu suşların 63'ü (%76) rutin taramalarda perianal sürüntü örneklerinden, 20'si (%24) ise nozokomiyal enfeksiyon tanısı almış hastaların farklı klinik materyallerinden izole edildi. Klinik materyallerin 8'i kan, 5'i idrar, 3'ü yara/pü, 2'si santral kateter, 1'i periton sıvısı ve 1'i de boğaz örneği olup aslında bu 20 klinik materyal de çalışmamızda yer alan ve perianal sürüntü kültürlerinde VRE izole edilen 63 hastanın 18'inden izole edilmişti. Çalışmadaki izolatların elde edildiği 63 hastanın 45'inde VRE kolonize iken, 18'inde VRE'ye bağlı nozokomiyal enfeksiyon tanısı ve birden fazla materyalinde (2 hastanın 3 farklı materyalinde, 16 hastanın 2 farklı materyinde) VRE izole edildiği gözlemlendi.

Çalışmaya dahil edilen VRE'ler izolasyon dönemlerine göre beş grup altında değerlendirildi (Tablo-6).

Grup 1: 2009 yılının son 3 aylık periyodunda (Ekim, Kasım, Aralık) izole edilen VRE suşlarından seçilen 26 *E. faecium* suşu bu grupta değerlendirildi. Bu 26 izolat, 20 ayrı hastadan izole edilirken, 1 hastanın 3 farklı materyalinde (perianal sürüntü-kateter-kan), 4 hastanın 2 farklı materyinde (2 hastada perianal sürüntü-kan, 1 hastada perianal sürüntü-

yara/pü, 1 hastada perianal sürüntü-idrar) ve geriye kalan 15 hastanın da perianal sürüntü örneklerinde VRE izole edildi. Bu grupta değerlendirilen izolatların farklı klinik ve yoğun bakımlarda takip edilen hastalara ait örneklerden izole edildiği, hastaların 14'ünün (%70) kadın ve 6'sının (%30) erkek olduğu tespit edildi. Grup 1'de değerlendirilen izolatlara 1'den 26'ya kadar izolat numarası verildi.

Grup 2: 2007 yılının Ağustos, Eylül, Ekim aylarını kapsayan 3 aylık periyodunda izole edilen VRE suşlarından seçilen 13 *E. faecium* suşu bu grupta değerlendirildi. Bu 13 izolat 12 ayrı hastadan izole edilirken, 1 hastanın 2 farklı materyalinde (perianal sürüntü, periton sıvısı) ve geriye kalan 11 hastanın da perianal sürüntü örneklerinde VRE izole edildi. Bu grupta değerlendirilen izolatların elde edildiği hastaların 8'inin (%66.7) erkek, 4'ünün (%33.3) kadın cinsiyetine sahip, Çocuk Kliniğinde takip edilen hastalar olduğu tespit edildi. Grup 2'de değerlendirilen izolatlara 27'den 39'a kadar izolat numarası verildi.

Grup 3: 2003 yılının ilk 3 aylık periyodunda (Ocak, Şubat, Mart) izole edilen VRE suşlarından seçilen 14 *E. faecium* suşu bu grupta değerlendirildi. Bu 14 izolat 11 ayrı hastadan izole edilirken, 3 hastanın 2 farklı materyalinde (2 hastada perianal sürüntü-idrar, 1 hastada perianal sürüntü-boğaz) ve geriye kalan 8 hastanın da perianal sürüntü örneklerinde VRE izole edildi. Bu grupta değerlendirilen izolatların elde edildiği hastaların 6'sının (%54.6) erkek, 5'inin (%45.4) kadın olduğu, 9'unun Çocuk Klinik ve Yoğun Bakım, 2'sinin ise Hematoloji Kliniğinde takip edilen hastalardan elde edildiği görüldü. Grup 3'te değerlendirilen izolatlara 40'tan 53'e kadar izolat numarası verildi.

Grup 4: 2002 yılının ilk 3 aylık periyodunda (Ocak, Şubat, Mart) izole edilen VRE suşlarından seçilen 17 *E. faecium* suşu bu grupta değerlendirildi. Bu 17 izolat 10 ayrı hastadan izole edilirken, 1 hastanın 3 farklı materyalinde (perianal sürüntü-santral kateter-kan), 5 hastanın 2 farklı materyinde (3 hastada perianal sürüntü-kan, 2 hastada perianal sürüntü-idrar) ve geriye kalan 4 hastanın da perianal sürüntü örneğinde VRE izole edildi. Bu grupta değerlendirilen izolatların elde edildiği hastaların 4'ünün (%40) erkek, 6'sının

(%60) kadın olduğu, 1'inin Çocuk Kliniğinde, 9'unun ise Hematoloji Kliniğinde takip edilen hastalar olduğu tespit edildi. Grup 4'te değerlendirilen izolatlar 54'ten 70'e kadar izolat numarası verildi.

Grup 5: 2001 yılının Mart, Nisan, Mayıs aylarını kapsayan 3 aylık periyodunda izole edilen VRE suşlarından seçilen 13 *E. faecium* suşu bu grupta değerlendirildi. Bu 13 izolat 10 ayrı hastadan izole edilirken, 3 hastanın 2 farklı materyalinde (1 hastada perianal sürüntü-kan, 1 hastada perianal sürüntü-idrar, 1 hastada perianal sürüntü-yara/pü) ve geriye kalan 7 hastanın da perianal sürüntü örneğinde VRE izole edildi. Bu grupta değerlendirilen izolatların farklı klinik ve yoğun bakımlarda takip edilen hastalara ait örneklerden izole edildiği, hastaların 7'sinin (%70) erkek, 3'ünün (%30) kadın olduğu tespit edildi. Grup 5'te değerlendirilen izolatlar 71'den 83'e kadar izolat numarası verildi.

Tablo-6: 83 VRE suşunun izole edildiği klinik ve materyale göre dağılımı.

| Grup | Klinik | Suş sayısı (n) | (%) | Materyal | Suş sayısı (n) | (%) |
|---------------|---------------------|----------------|---------------|---------------------|----------------|-----|
| Grup 1 | Enfeksiyon | 8 | 30 | Perianal | 20 | 77 |
| | Hematoloji | 5 | 19 | Kan | 3 | 11 |
| | Göğüs Hast. | 4 | 15 | Kateter | 1 | 4 |
| | Göğüs Y.B. | 3 | 12 | Yara-pü | 1 | 4 |
| | Onkoloji | 3 | 12 | İdrar | 1 | 4 |
| | Reanimasyon | 3 | 12 | - | - | - |
| | Toplam | | 26 | 100 | Toplam | 26 |
| Grup 2 | Çocuk | 13 | 100 | Perianal | 12 | 92 |
| | - | - | - | Periton sıvısı | 1 | 8 |
| | Toplam | 13 | 100 | Toplam | 13 | 100 |
| Grup 3 | Çocuk Y.B. | 8 | 57 | Perianal | 11 | 79 |
| | Hematoloji | 4 | 29 | İdrar | 1 | 7 |
| | Çocuk | 2 | 14 | Yara-pü | 1 | 7 |
| | - | - | - | Boğaz | 1 | 7 |
| Toplam | 14 | 100 | Toplam | 14 | 100 | |
| Grup 4 | Hematoloji | 15 | 88 | Perianal | 10 | 59 |
| | Çocuk | 2 | 12 | Kan | 4 | 23 |
| | - | - | - | İdrar | 2 | 12 |
| | - | - | - | Kateter | 1 | 6 |
| Toplam | 17 | 100 | Toplam | 17 | 100 | |
| Grup 5 | Reanimasyon | 5 | 39 | Perianal | 10 | 76 |
| | Nöroloji Y.B. | 3 | 23 | Kan | 1 | 8 |
| | Yanık Ünitesi | 3 | 23 | İdrar | 1 | 8 |
| | Çocuk Y.B. | 2 | 15 | Yara-pü | 1 | 8 |
| Toplam | 13 | 100 | Toplam | 13 | 100 | |
| Tüm Gruplar | Hematoloji | 24 | 29 | Perianal | 63 | 76 |
| | Çocuk | 17 | 20 | Kan | 8 | 9 |
| | Çocuk Y.B. | 10 | 12 | İdrar | 5 | 6 |
| | Enfeksiyon | 8 | 9 | Yara-pü | 3 | 4 |
| | Reanimasyon | 8 | 9 | Kateter | 2 | 3 |
| | Göğüs Hast. | 4 | 5 | Periton sıvısı | 1 | 1 |
| | Göğüs Y.B. | 3 | 4 | Boğaz | 1 | 1 |
| | Onkoloji | 3 | 4 | - | - | - |
| | Nöroloji Y.B. | 3 | 4 | - | - | - |
| | Yanık Ünitesi | 3 | 4 | - | - | - |
| | Genel Toplam | 83 | 100 | Genel Toplam | 83 | 100 |

3. Moleküler Çalışma

Epidemi dönemlerinde izole edilen VRE suşlarının aynı klondan mı yoksa farklı klonların yayılması şeklinde mi olduğunu anlamak için yüksek ayırım gücüne sahip genotipik yöntemlerle tiplendirilmeleri gerekmektedir. Bu çalışmada klonal ilişkinin tespitinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi ile PFGE yönteminin uygulanamadığı laboratuvarlar için iyi bir alternatif olarak önerilen AP-PCR yöntemi kullanılmıştır. Yöntemlerin

tekrarlanabilirliği ve stabilitesini tespit etmek için her iki yöntemle de yapılan inceleme iki kez tekrarlanmıştır.

Moleküler çalışmaya alınacak izolatların kanlı agarda elde edilen saf kültürlerinden steril eküvyonla bol miktarda alınarak mikrobank (Mast Diagnostics) saklama tüpleri içerisindeki koruyucu sıvıda yoğun süspansiyon haline getirildi. Mikrobank alkalanmak sureti ile bakteri süspansiyonunun tp içerisinde yer alan adsorban boncuklarla temas etmesi sağlandı. Daha sonra içerisindeki sıvı steril pastör pipeti ile aspire edildi. Moleküler alışma yapılana kadar mikrobanklar -20°C'de saklandı.

3.1. AP-PCR

AP-PCR yöntemi; Yanmen Wang ve arkadaşlarının metoduna uygun şekilde yapıldı. Bu yöntemde bakteri DNA'sı random seçilmiş kısa primer olan S13 primeri (5'-TTCCCCCGCT-3') ile 42°C'lik annealing ısısında amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Oluşan amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezde yürütüldü. Elde edilen bantların polimorfizmine göre klon analizi yapıldı.

1- Kültür Plaklarından DNA Ekstraksiyonu

1. Saf olarak elde edilen enterokok kolonileri distile su ile Mc Farland 6 bulanıklığında süspanse edildi.
2. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500 µl ependorf tüpe alınarak 8000xg' de 3 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
3. Üst sıvı atılıp pelletin üzerine 500 µl TE buffer (10mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) eklendi.
4. -80°C'de en az 24 saat bekletildi, bu süre sonunda oda sıcaklığında iyice çözülene kadar tutuldu.
5. Sonra 100°C'de, 10 dakika kuru ısı bloğunda (Wealtec Corp. HB- 1) tutuldu.
6. 12.000xg'de 3 dakika, + 4°C'de santrifüj edildi.
7. 200 µl süpernatant alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı. Spektrofotometrede (THERMO NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer) DNA kantitasyonu yapılan rnekler PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

2- S13 Primeri ile Amplifikasyon

Amplifikasyon işlemi 25 µl PCR karışımında gerçekleştirildi. Her reaksiyon karışımı 2.5 µl 10x PCR buffer, 3.5 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 200 µM, 0.8 µl primer (100 pmol/µl stok solüsyondan), 3 U Taq polymerase, 6 µl Enterokok DNA ekstraktı ve steril distile su ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlandı.

Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (ESCO Swift Max Thermal Cycler/ABD) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı

94°C'de 5 dakika ilk denaturasyon

94°C'de 50 saniye denaturasyon

42°C'de 1 dakika bağlanma (annealing)

72°C'de 75 saniye uzama (extension)

72°C'de 10 dakika son uzama

45 siklus

3- PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Tespiti

Amplifikasyon işlemi sonrasında oluşan farklı büyüklükteki fragmentlerin varlığını gösterebilmek amacı ile ampikonlar elektrikli ortamda agaroz jel içerisinde yürütüldü.

1. Elektrofrez matriksi olarak kullanılmak üzere %2'lik agaroz jel, 0.5xTris-Borik asit-EDTA (TBE) solüsyonu ile hazırlandı.

a. Bir balon içerisine tartılarak konulan 0.8 gr agaroz (Agarose low EEO, AppliChem, Germany) üzerine 40 ml 0.5xTBE ilave edildi.

b. Karışım homojenizasyon sağlanana kadar mikrodalga fırında eritildi.

c. 60°C'nin altına düşmeyecek şekilde oda sıcaklığında soğutuldu.

d. Eriyik haldeki agaroz içerisine 10 mg/ml'lik etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µl eklendi.

e. Hazırlanan agaroz jel, önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.

f. Oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilerek jel kalıbının katılaşması sağlandı.

g. Jel kalıbı elektrofrez tankına (BioRad MINI-SUB^R Cell GT, USA) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.

2. Örneklerden 10'ar µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl yükleme tamponuna (BioRad Basic inc. Loading buffer) karıştırıldı. Son kuyuya DNA markerı (BIB Basic inc. DNA 100bp Marker) ve diğer kuyulara her birine bir örnek olacak şekilde bu karışımdan 10 µl yüklendi.

3. Tankın güç kaynağı (BioRad Power PAC 300,USA) çalıştırılarak 100 V akımda, 50 dakika elektroforez uygulandı.

3- Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

1. Elektroforezden sonra DNA bantları BioDocAnalyse (Biometra, Transilluminator, Almanya) cihazında UV ışığı altında görüntülenerek, dijital olarak fotoğraflandı ve TIFF formatında kayıt edildi.

2. Bant profillerinin analizi Refik Saydam Hızlısıhha Merkezi Başkanlığı–Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda, Bionumerics (Applied Maths, Inc., Belgium) version 6.01 yazılımı ile %1.5 bant toleransı ve %1 optimizasyon ayarı kullanılarak yapıldı. Öncelikle her resimde bulunan 1 adet standart marker (son kuyuda yürütülen) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı ve bant profillerinin dendrogramı oluşturuldu. AP-PCR dendrogramlarında %85 ve üzeri benzerlik katsayısına sahip izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve küçük harfle isimlendirildi. Her bir grup içindeki farklı kümeler ise rakamla gösterildi.

3.2. PFGE

PFGE ile yapılan incelemede, L. Garcia - Migura ve ark. (85) yöntemine uygun olarak hazırlanan kalıplar, Turabelidze ve ark. (86) önerdiği elektroforez şartlarında, CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, USA) cihazında yapıldı. Çalışma 8 adımda tamamlandı.

1- İzolatların Hazırlanması

Örnekler 7 basamaklı işlem ile PFGE için hazır hale getirilmiştir.

1. Tür düzeyinde tanımlaması yapılmış ve mikrobantaki bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı.

2. Bir gecelik 37°C'de inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi.

3. Buradaki tek koloniden tekrar kanlı agar besiyerine, tek koloni ekimine uygun olacak şekilde pasaj yapılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

4. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 2 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspansiyon edildi.

5. Bakteri yoğunluğu McFarland 6 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı.

6. Bu süspansiyondan 120 µl 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 10 mg/ml lizozom içeren stok solüsyondan 30 µl eklendi.

7. Bu tüpler 37°C'de benmaride (Siemens- Healthcare BS 402) 10 dakika inkübe edildi. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroz gömülecek ise oda sıcaklığında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi.

2- İzolatların Agaroz Gömülmesi

1. HST içerisinde %2'lik düşük erime sıcaklıklı agaroz (BIO-RAD, certified, Low Melt Agarose 161-3111) hazırlandı. Düşük erime sıcaklıklı agarozdan 25 ml'lik balonun içerisine 0,2 gram konuldu ve üzerine 10 ml HST eklendi. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konuldu. 1.5 ml'lik ependorf tüplere 100 µl dağıtıldı ve 45-50°C'deki kuru ısı bloğunda kullanılabilecek kadar bekletildi.

2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtuldu.

3. İnkübasyondan sonra hemen bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime sıcaklıklı agaroz bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı.

4. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (10mm x 5mm x 1,5mm, Bio Rad Laboratories) konuldu.

5. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 20 dakika bekletildi. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken, agarozun homojen katılaşması sağlanmaktadır.

3- Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 1 ml Hücre Lizis Solüsyonu-1 (HLS-1) [10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, %0.2 sodyum deoksikolat, %0.5 sarkozil] konuldu.

2. İçinde bakteri bulunan agaroz kalıptan çıkarılıp lizis solüsyonuna yerleştirildi.

3. Kalıplar 37°C'de 2 saat su banyosunda bekletildi.

4. HLS-1 dökülerek, yerine 1 ml Hücre Lizis Solüsyonu-2 (HLS-2) [ES: 250 mM EDTA (pH 9.0), %1 sarkozil, 50 mikrogram/ml proteinaz K] konuldu.

10 mL HLS-2 hazırlamak için;

Proteinaz K (10 mg/ml).....50 mikrolitre

ES çözeltisi: 250 mM EDTA (pH 9.0), %1 sarkozil.....9950 mikrolitre

50°C'de 1 saat su banyosunda bekletildi.

4- Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkınması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler +4°C'de en az 15 dakika bekletildi ve dikkatlice HLS-2 aspire edildi.

2. Daha sonra agaroz kalıpları önce 4 ml ultrapür saf su ile bir defa ve 4 ml TE tamponuyla üç defa olmak üzere, 50°C'de 30'ar dakika ile süre toplam dört kez yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

5- Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın RE ile Kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla ¼ oranında kesildi. Restriksiyon enzimi olarak Smal kullanıldı. Parçalardan biri, 100 µl 1x Smal tamponu içine konularak su banyosunda 30°C'de 10-15 dakika bekletildi.

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde kalıp başına 25 ünite Smal enzimi (Sigma, Lot 012K1216) konuldu. (10 µl 10xSmal tamponu, 2.5 µl Smal enzimi (10 U / µl), 87.5 µl steril distile su)

3. Agaroz kalıbının içerisinde bekletildiği enzim tamponu aspire edildi. Üzerine hazırlanan enzimli karışımdan eklenerek su banyosunda 30°C'de, 2 saat inkübe edildi.

4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Kalıplar elektroforez için hazır hale geldi.

6- Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

1. 100 ml 0.5x TBE içinde %1 agaroz (Pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories 162-0137) hazırlandı.

a) 1 g pulsed-field certified agarose balona konuldu. Üzerine 100 ml 0.5xTBE tamponu eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı.

b) Balon mikrodalga fırında 60 saniye tutuldu, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı ve tekrar 15 saniye mikrodalga fırında tutularak agarozun iyice çözünmesi sağlandı. Sonra balon 45-50°C'lik su banyosunda bekletildi.

2. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı. Su terazisi ile zeminin düzgün olduğu kontrol edildi.

3. RE ile kesilmiş olan DNA içeren agaroz kalıplarının her biri, 10'lu dişli tarağın dişlerinin uç kısmına ve tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde yerleştirildi. Her çalışmada tarağın kenarındaki dişlere kontrol suşuna ait kalıplar (ATCC suşu) moleküler standart marker olarak yüklendi.

4. Kurutma kağıdı ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz dikkati bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içerisine döküldü.

6. Oda sıcaklığında 20–30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı.

7. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5xTBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

7- Elektroforez

Agaroz, CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, USA) elektroforeze tabii tutuldu. Elektroforez şartları aşağıdaki gibi uygulandı.

(Başlangıç vuruş süresi 5.3 sn, bitiş vuruş süresi 34.9 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat).

8- Görüntüleme ve Bant Profillerinin Analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml 0.5xTBE tamponu içine alınıp 20 dakika boyandı.

2. BioDocAnalyse (Biometra, Transilluminator, Almanya) cihazında UV ışığı altında görüntülenerek, dijital olarak fotoğraflandı ve TIFF formatında kayıt edildi.

3. Bant profillerinin analizi Refik Saydam Hızlısıhha Merkezi Başkanlığı–Moleküler Mikrobiyoloji Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı'nda, Bionumerics (Applied Maths, Inc., Belgium) version 6.01 yazılımı ile %1.5 bant toleransı ve %1 optimizasyon ayarı kullanılarak yapıldı. Öncelikle her resimde bulunan 1 adet standart marker (*E. faecium* ATCC-19434) yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı ve bant profillerinin dendrogramı oluşturuldu. PFGE dendrogramlarında %85 ve üzeri benzerlik katsayısına sahip izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Her bir grup içindeki farklı kümeler ise rakamla gösterildi.

BULGULAR

Rutin VRE taramaları sırasında perianal sürüntü örneklerinden ve klinik materyallerden izole edilen suşların glikopeptit türü antibiyotiklere karşı direnç düzeyleri belirlendi. Ayrıca 83 VR *E. faecium* suşunun hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi açısından klonal ilişkilerinin tespit edildiği bu çalışmada PFGE ve AP-PCR yöntemleri kullanıldı.

Çalışmada 9 yıllık periyot boyunca 257 farklı hastadan alınan örneklerden izole edilen toplam 664 VRE suşunun türlere göre dağılımına bakıldığında 651 (%98)'inin VR *E. faecium* suşu olduğu tespit edildi.

Çalışmadaki tüm gruplarda değerlendirilen 83 izolatin vankomisin ve teikoplanin E-test yöntemi ile saptanan MİK değerlerine göre, fenotipik *vanA* tipi direnç profiline sahip olduğu tespit edildi. Vankomisin MİK değeri tüm izolatlarda 256 µg/ml'nin üzerinde iken, teikoplanin MİK değeri 16 µg/ml'nin üzerindeki değerlerde tespit edildi (Tablo-7).

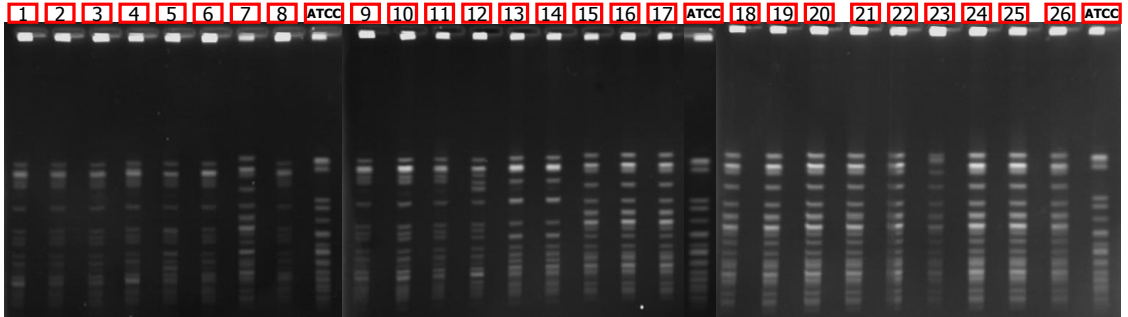
Tablo-7: E-test yöntemi ile 83 VRE suşunun vankomisin ve teikoplanin duyarlılık sonuçları.

| Gruplar | Vankomisin MİK (µg/ml) | | | | Teikoplanin MİK (µg/ml) | | | |
|---------|------------------------|--------|---------|------|-------------------------|--------|---------|------|
| | 4-16 | >16-64 | >64-256 | >256 | 2-16 | >16-64 | >64-256 | >256 |
| | Sayı | Sayı | Sayı | Sayı | Sayı | Sayı | Sayı | Sayı |
| Grup 1 | - | - | - | 26 | - | 1 | - | 25 |
| Grup 2 | - | - | - | 13 | - | 1 | 5 | 7 |
| Grup 3 | - | - | - | 14 | - | 5 | 5 | 4 |
| Grup 4 | - | - | - | 17 | - | 1 | 5 | 11 |
| Grup 5 | - | - | - | 13 | - | 1 | 2 | 10 |
| Toplam | - | - | - | 83 | - | 9 | 17 | 57 |

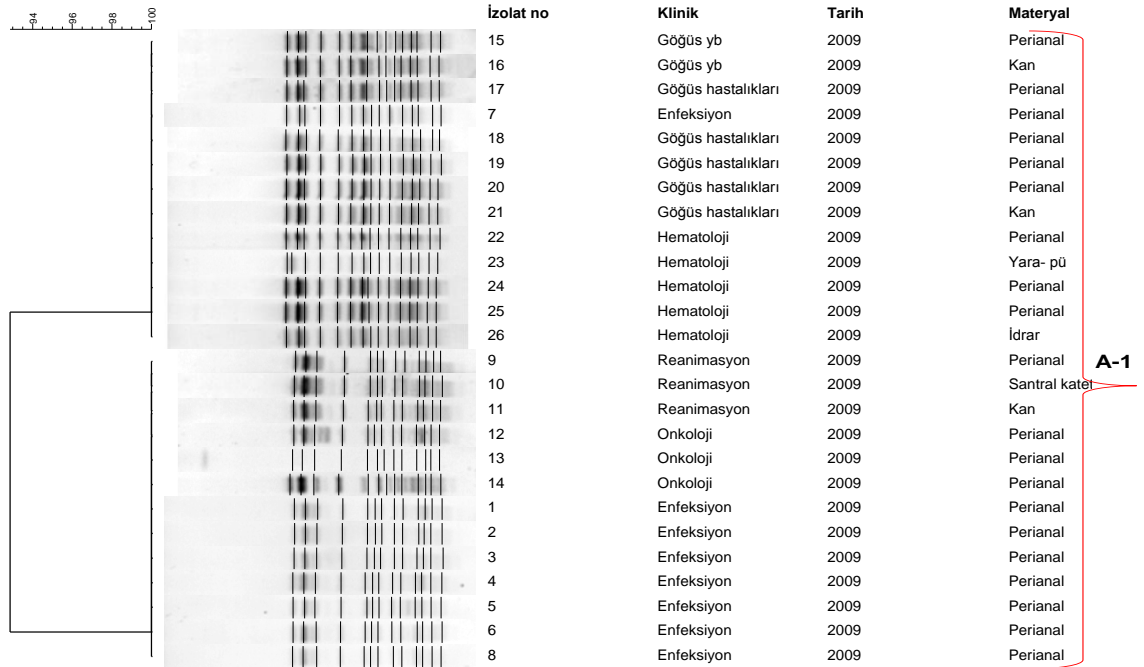
Grup 1 içinde, 2009 yılının Ekim, Kasım ve Aralık aylarında Enfeksiyon, Onkoloji, Hematoloji, Reanimasyon ünitesi, Göğüs Hastalıkları Klinik ve Yoğun bakım Ünitesinde izole edilen VRE suşlarından seçilerek

çalışmaya dahil edilen 26 *E. faecium* suşunun muhtemel klonal ilişkisini belirlemek amacı ile genomik özelliklerinin PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık 50 kb ile 600 kb arasında değişen büyüklükte, 14-15 banttıan oluşan bir profil elde edildi (şekil-3).

Bionumerics (Applied Maths, Inc., Belgium) version 6.01 yazılımı ile bant profillerinin değerlendirilmesi sonucu 26 suşun da tek bir gen kümesinde (A-1) yer aldıkları tespit edildi. A-1 kümesinde yer alan bu 26 izolatın 13 tanesi %100 uyumlu iken diğer 13 izolatın da kendi içinde %100 uyumlu olduğu, tüm izolatların ise en az %92 benzerlik gösterdiği tespit edildi (şekil-4).



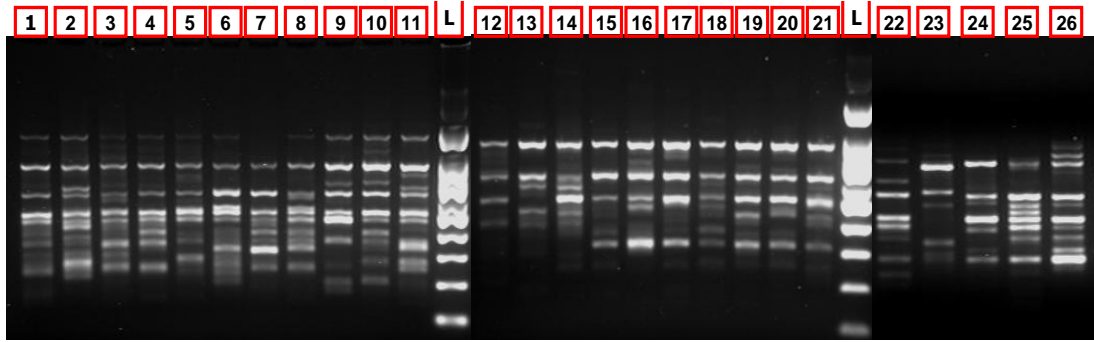
şekil-3: Grup1'deki 26 VRE suşunun PFGE ile elde edilen jel görüntüsü.



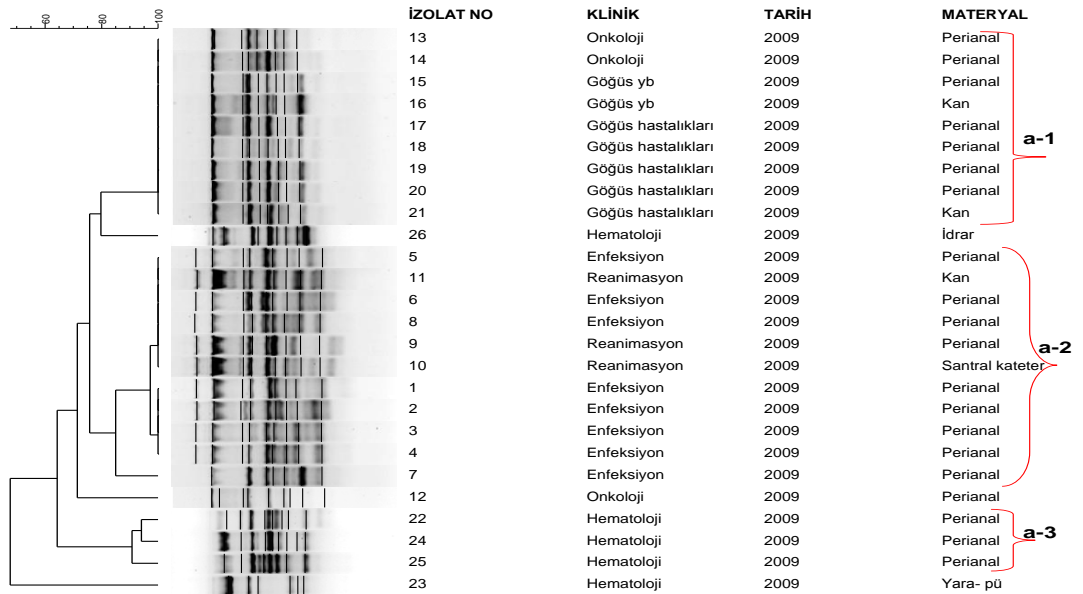
şekil-4: Grup1'deki 26 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.

Grup 1 içindeki 26 VR *E. faecium* suşuna ait genomik DNA örneklerinin klonal ilişkisini tespit etmede kullanılan diğer bir moleküler epidemiyolojik yöntem olan AP-PCR ile amplifikasyonu sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 100 kb ile 1500 kb arasında değişen büyüklükte, 6-9 banttan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-5).

Bionumerics (Applied Maths, Inc., Belgium) version 6.01 yazılımı ile AP-PCR bant profillerinin değerlendirilmesi sonucu 3 farklı gen kümesi içinde (a-1, a-2, a-3) yer aldıkları tespit edildi. a-1 gen kümesinde 9, a-2'de 11, a-3'te 3 izolatin yer aldığı bu 3 kümenin dışında kalan ve kendi aralarında farklı olan 3 izolat olduğu görüldü (Şekil-6).



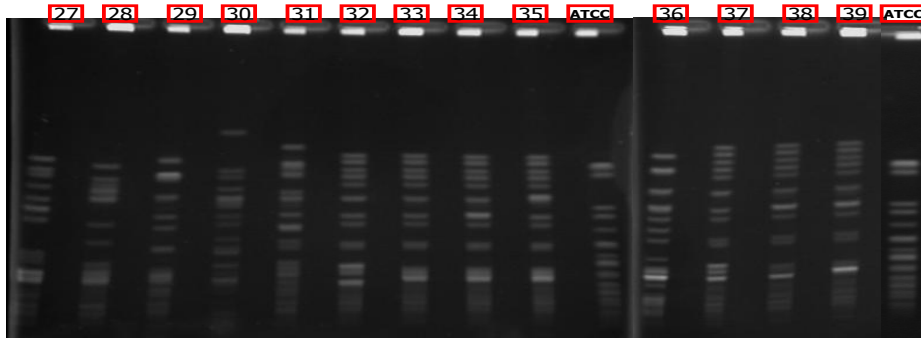
Şekil-5: Grup1'deki 26 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen jel görüntüsü



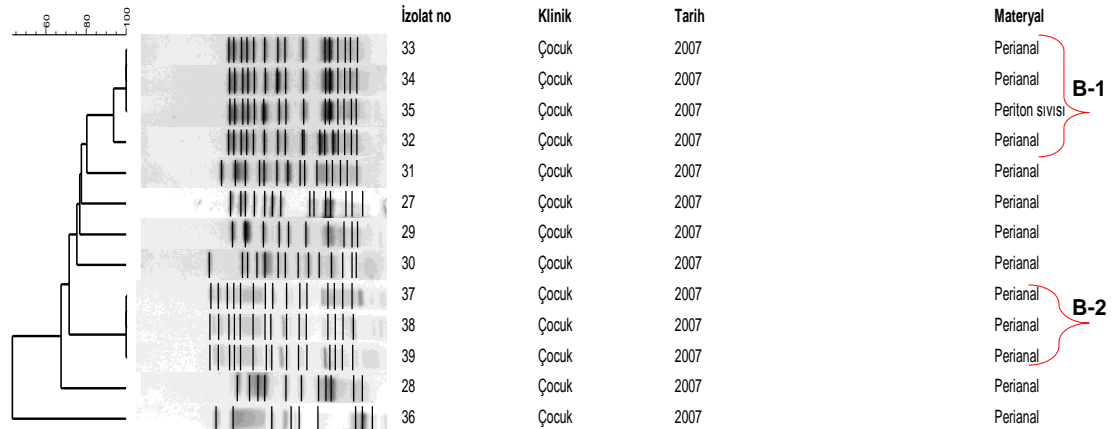
Şekil-6: Grup1'deki 26 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen dendrogramı.

Grup 2 içinde, 2007 yılının Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında Çocuk Kliniğinde izole edilen VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 13 *E. faecium* genomunun PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık 50 kb ile 700 kb arası büyüklükte, 9-16 banttıan oluştıan bir profil elde edildi (Şekil-7).

PFGE'deki bu bant profillerinin Bionumerics yazılımı ile değerlendirilmesi sonucu; 4 izolatın bulunduğu B-1, 3 izolatın bulunduğu B-2 klon kümeleri ile bu kümelerin dışında kalan 6 farklı izolat olduğu tespit edildi. Bu 6 izolatın da 5'i hem kendi aralarında hem de B-1 ve B-2 klon kümeleriyle %70-80 oranında benzerlik gösterdiği, 1 izolatın ise (36 nolu izolat) gruptaki diğer tüm izolatlardan oldukça farklı bir bant profili gösterdiği tespit edildi. B-1 kümesinde yer alan 3 izolat (33, 34, 35 nolu izolatlar) %100 uyumlu iken aynı küme içine giren 32 nolu izolat %92 benzerlik gösterdi. B-2 kümesinde yer alan 37, 38 ve 39 nolu izolatlar %100 uyumlu bulundu (Şekil-8).



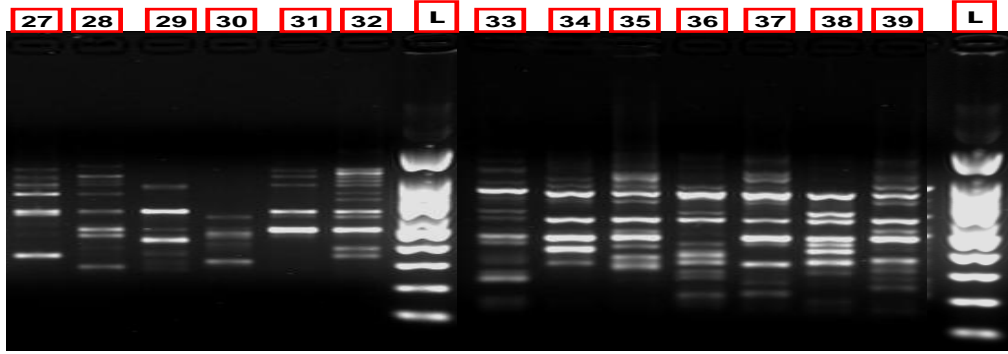
Şekil-7: Grup2'deki 13 VRE suşunun PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



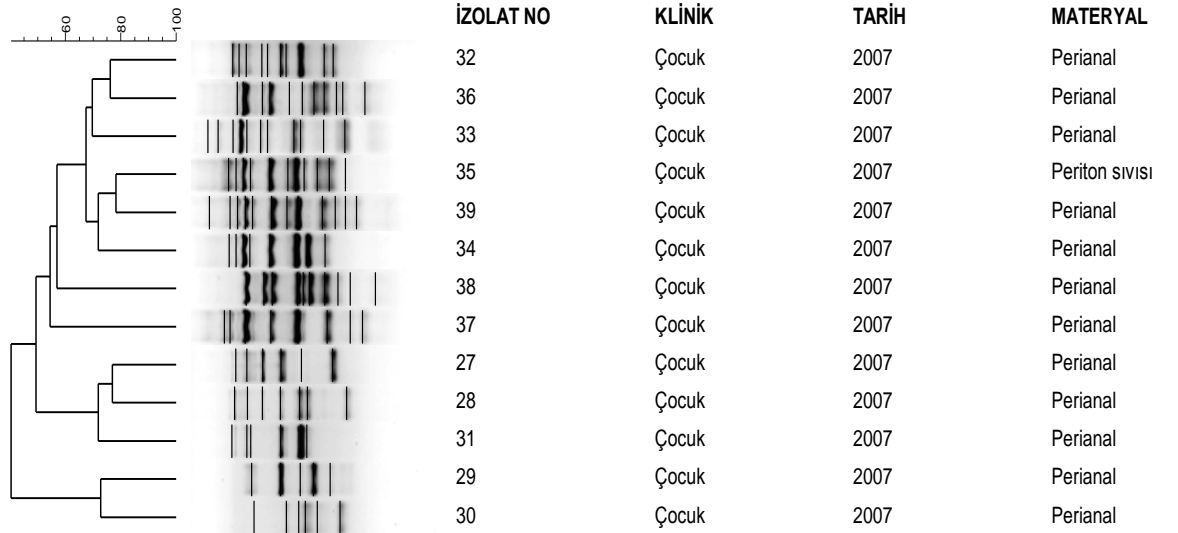
Şekil-8: Grup2'deki 13 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.

Grup 2 içindeki 13 VR *E. faecium* suşuna ait genomik DNA örneklerinin klonal ilişkisinin tespitinde kullanılan AP-PCR ile amplifikasyonu sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 100 kb ile 1500 kb arasında değişen büyüklükte, 5-10 banttıan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-9).

Bionumerics yazılım programı ile AP-PCR bant profillerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen dendrogramlara göre; aralarında en az %45-80 arası benzerlik gösteren 13 farklı izolata ait profil elde edildi. Aynı grubun PFGE'de elde edilen klon kümelerinin AP-PCR yöntemi ile oluşmadığı, bu grupta aralarında anlamlı bir benzerlik olmayan farklı klonlara ait AP-PCR profili elde edildi (Şekil-10).



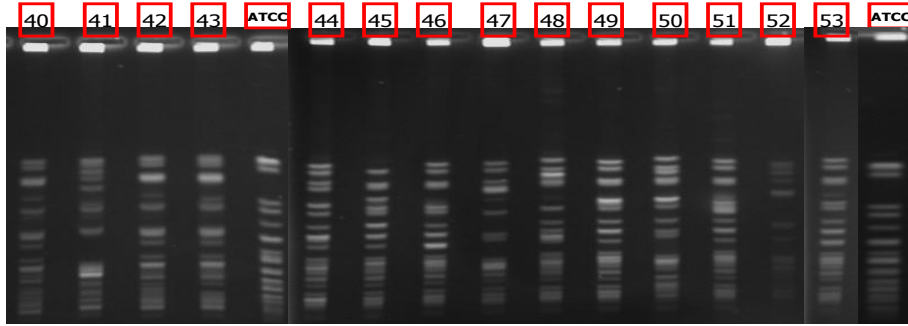
Şekil-9: Grup2'deki 13 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen jel görüntüsü.



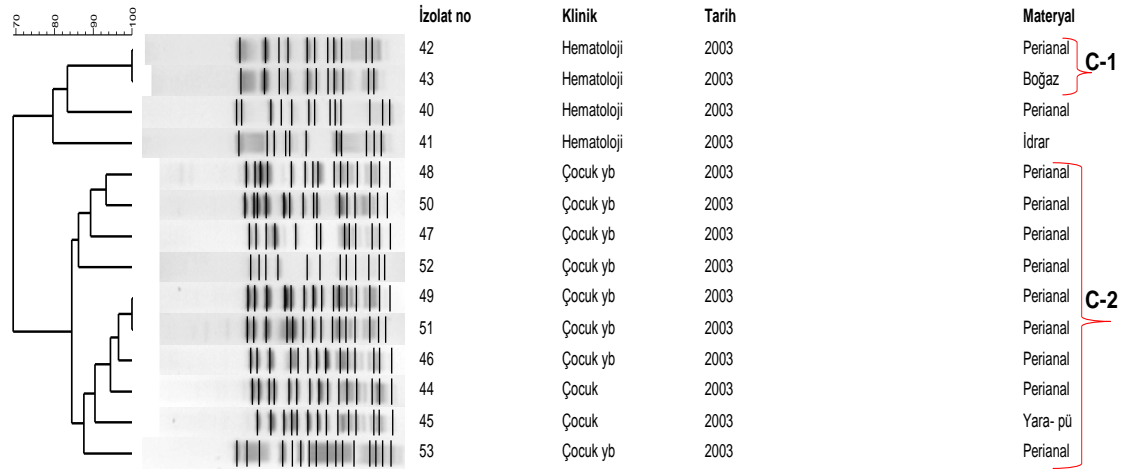
Şekil-10: Grup2'deki 13 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen dendrogramı.

Grup 3 içinde, 2003 yılının Ocak, Şubat ve Mart aylarında Hematoloji, Çocuk Klinik ve Yoğun Bakım Ünitesi'nde izole edilen VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 14 *E. faecium* izolat genomunun PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50 kb ile 600 kb arasında değişen büyüklükte, 11-16 banttıan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-11).

PFGE'deki bu bant profillerinin Bionumerics yazılımı ile değerlendirilmesi sonucu; 2 izolatın bulunduğu C-1, 10 izolatın bulunduğu C-2 klon kümeleri oluşurken bu kümelerin dışında kalan 2 farklı izolat (40 ve 41 nolu izolatlar) olduğu tespit edildi. Bu 2 izolatın Hematoloji Kliniği'nde yatan aynı hastanın sırasıyla perianal sürüntü ve idrar örneklerinden izole edildiği ve kendi aralarında %80 benzerlik gösterdiği tespit edildi. Gruptaki tüm izolatlar ise aralarında en az %70 benzerlik bulundu (Şekil-12).



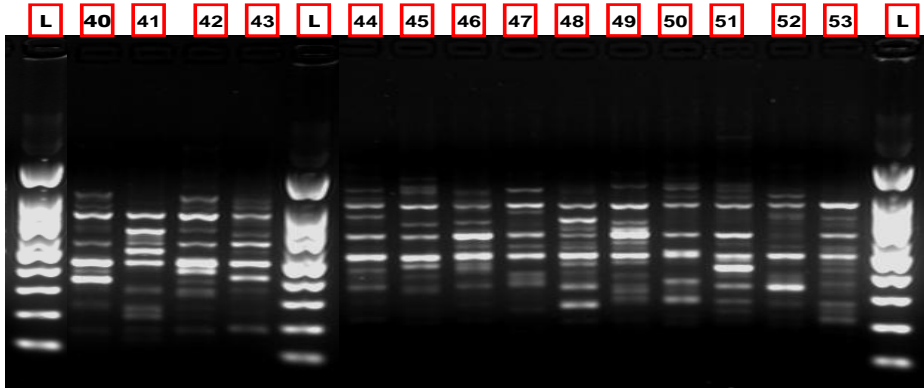
Şekil-11: Grup3'teki 14 VRE suşunun PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



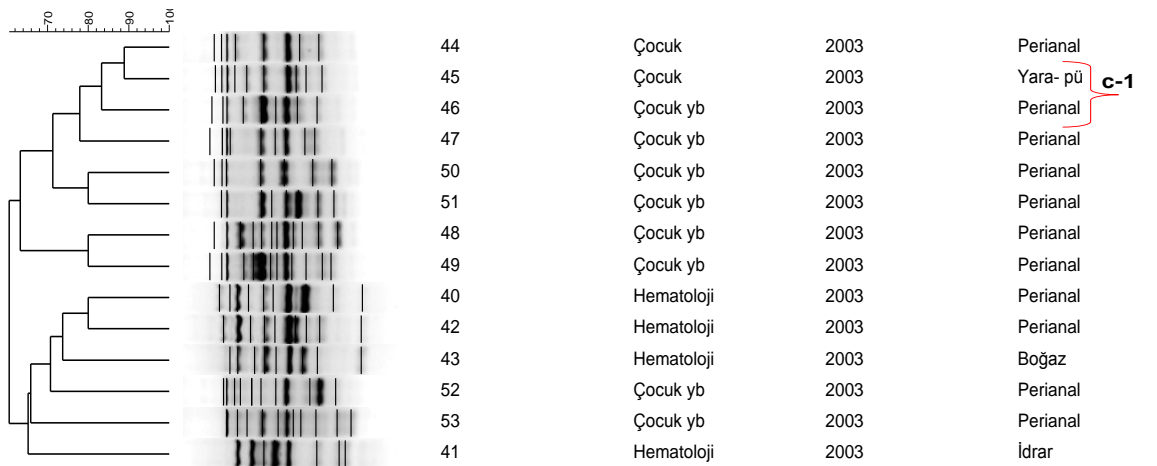
Şekil-12: Grup3'teki 14 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.

Grup 3 içindeki 14 VR *E. faecium* suşuna ait genomik DNA örneklerinin klonal ilişkisinin tespitinde AP-PCR ile amplifikasyonu sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 100 kb ile 1500 kb arasında değişen büyüklükte, 7-12 banttı oluşıan bir profil elde edildi (Şekil-13).

Bionumerics yazılım programı ile AP-PCR bant profillerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen dendrogramlara göre; %90 uyumlu 2 izolatin bulunduğu c-1 klonal küme dışında, aralarında en az %62-82 arası benzerlik gösteren 12 farklı izolata ait profil elde edildi. Aynı grubun PFGE'de elde edilen klon kümelerinin AP-PCR yöntemi ile oluşmadığı, bu grupta aralarında anlamlı bir benzerlik olmayan farklı klonlara ait AP-PCR profili elde edildi (Şekil-14).



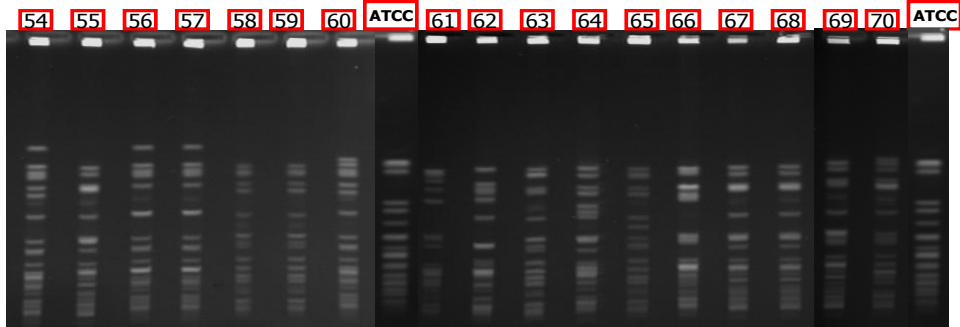
Şekil-13: Grup3'teki 14 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen jel görüntüsü



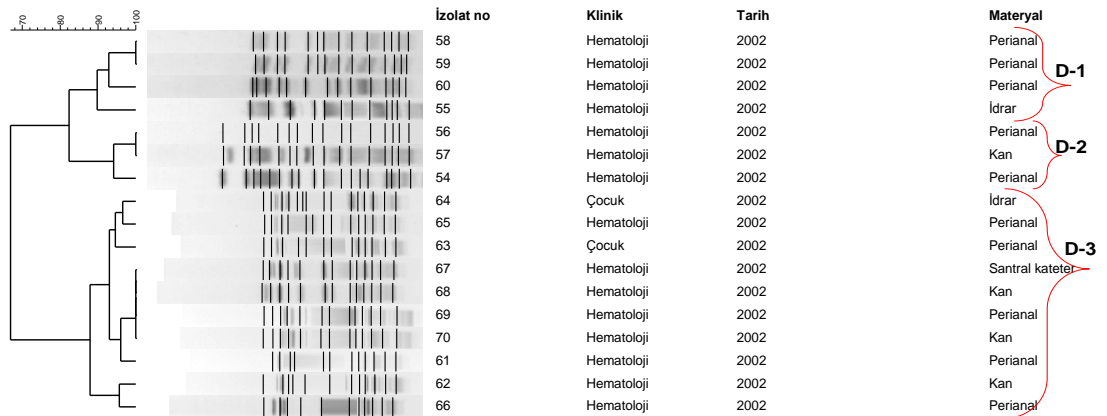
Şekil-14: Grup3'teki 14 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen dendrogramı.

Grup 4 içinde, 2002 yılının Ocak, Şubat ve Mart aylarında Çocuk Kliniği ve Hematoloji'de izole edilen VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 17 *E. faecium* izolat genomunun PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50 kb ile 700 kb arasında değişen büyüklükte, 11-18 banttıan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-15).

PFGE'deki bu bant profillerinin Bionumerics yazılımı ile değerlendirilmesi sonucu; 4 izolatın bulunduğu D-1, 3 izolatın bulunduğu D-2 ve 10 izolatın bulunduğu D-3 klon kümelerinin oluştuğu tespit edildi. D-1 klonal kümedeki 2 izolat (58, 59 nolu izolatlar), D-2 klonal kümedeki 2 izolat (56, 57 nolu izolatlar) ve D-3 klonal kümedeki 4 izolat (67, 68, 69, 70 nolu izolatlar) kendi aralarında %100 uyumlu bulundu. Ayrıca D-1 klonal küme ile D-2 klonal küme arasında %82 benzerlik varken bu iki kümenin D-3 klonal kümeyle benzerliği %68 olarak tespit edildi (Şekil-16).



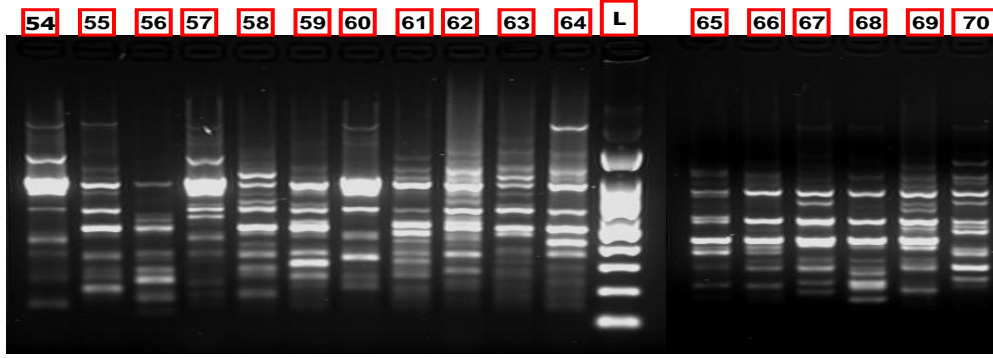
Şekil-15: Grup4'teki 17 VRE suşunun PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



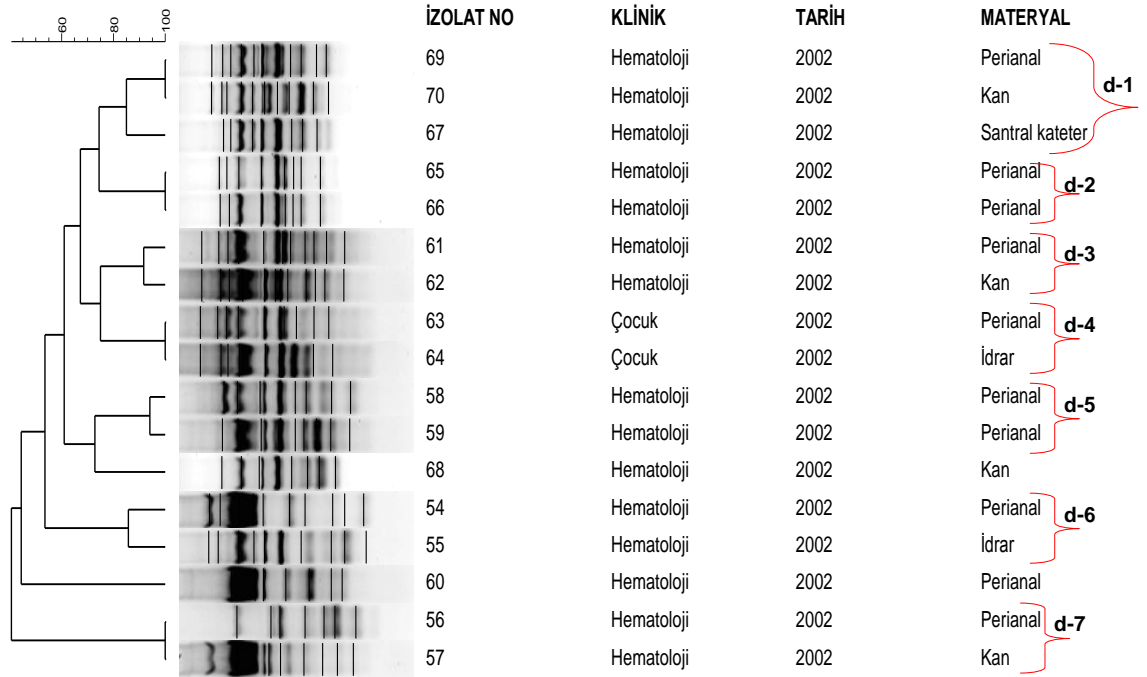
Şekil-16: Grup4'teki 17 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.

Grup 4 içindeki 17 VR *E. faecium* suşuna ait genomik DNA örneklerinin klonal ilişkisinin tespitinde kullanılan AP-PCR ile amplifikasyonu sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 100 kb ile 1500 kb arasında değişen büyüklükte, 7-12 banttıan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-17).

Bionumerics yazılım programı ile AP-PCR bant profillerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen dendrogramlara göre; 3 izolattın bulunduğu d-1 ile 2'şer izolattın bulunduğu d-2, d-3, d-4, d-5, d-6, d-7 klon kümeleri ile bu kümelerin dışında kalan 2 farklı izolat olduğu tespit edildi (Şekil-18).



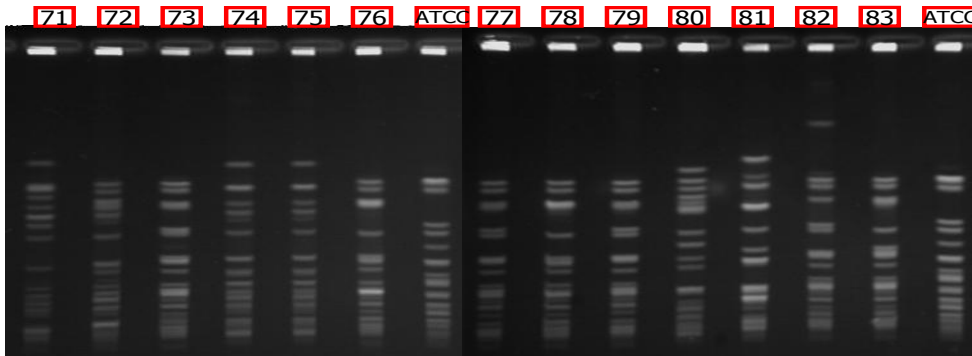
Şekil-17: Grup4'teki 17 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen jel görüntüsü.



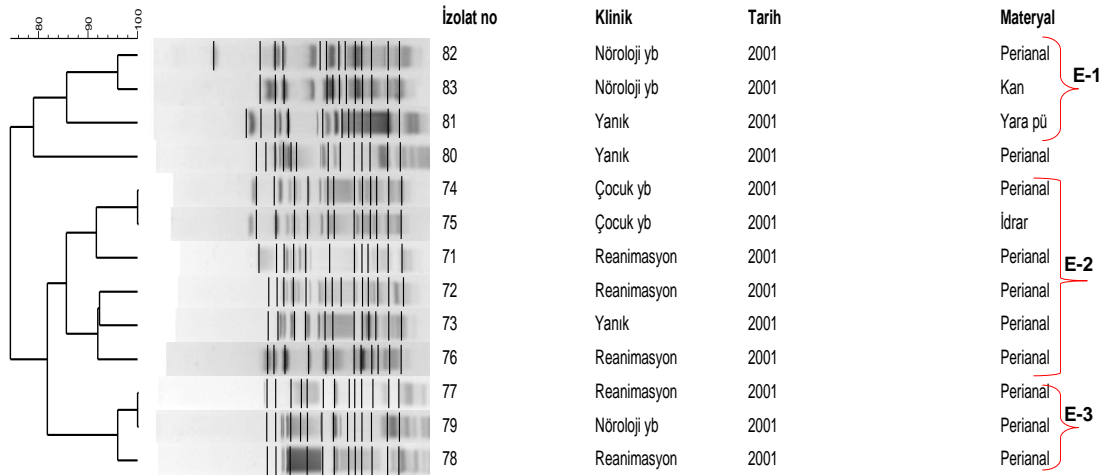
Şekil-18: Grup4'teki 17 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen dendrogramı.

Grup 5 içinde, 2001 yılının Mart, Nisan ve Mayıs aylarında Reanimasyon, Çocuk Yoğun Bakım, Nöroloji Yoğun Bakım ve Yanık Ünitesi'nde izole edilen VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 13 *E. faecium* izolat genomunun PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 50 kb ile 900 kb arasında değişen büyüklükte, 12-14 banttıan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-19).

PFGE'deki bu bant profillerinin Bionumerics yazılımı ile değerlendirilmesi sonucu; 3 izolattın bulunduğu E-1, 6 izolattın bulunduğu E-2, 3 izolattın bulunduğu E-3 klon kúmeleri oluşurken bu kúmelerin dışında kalan 1 farklı izolat (80 nolu izolat) olduğu tespit edildi. E-2 ve E-3 klonal kúmeler arasında %82, farklı olan 80 nolu izolat ile E-1 klonal kúme arasında %80 benzerlik olduğu tespit edildi. Gruptaki tüm izolattlar ise aralarında en az %74 benzer bulundu (Şekil-20).



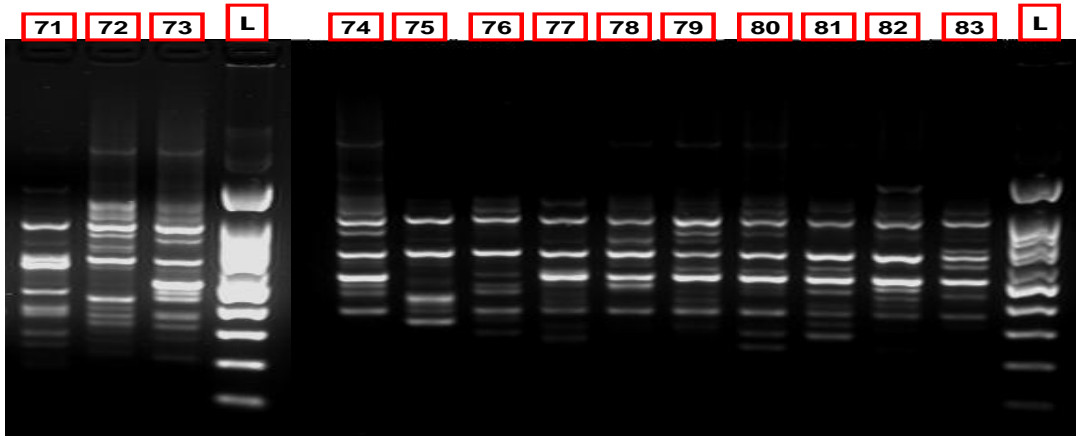
Şekil-19: Grup5'teki 13 VRE suşunun PFGE ile elde edilen jel görüntüsü



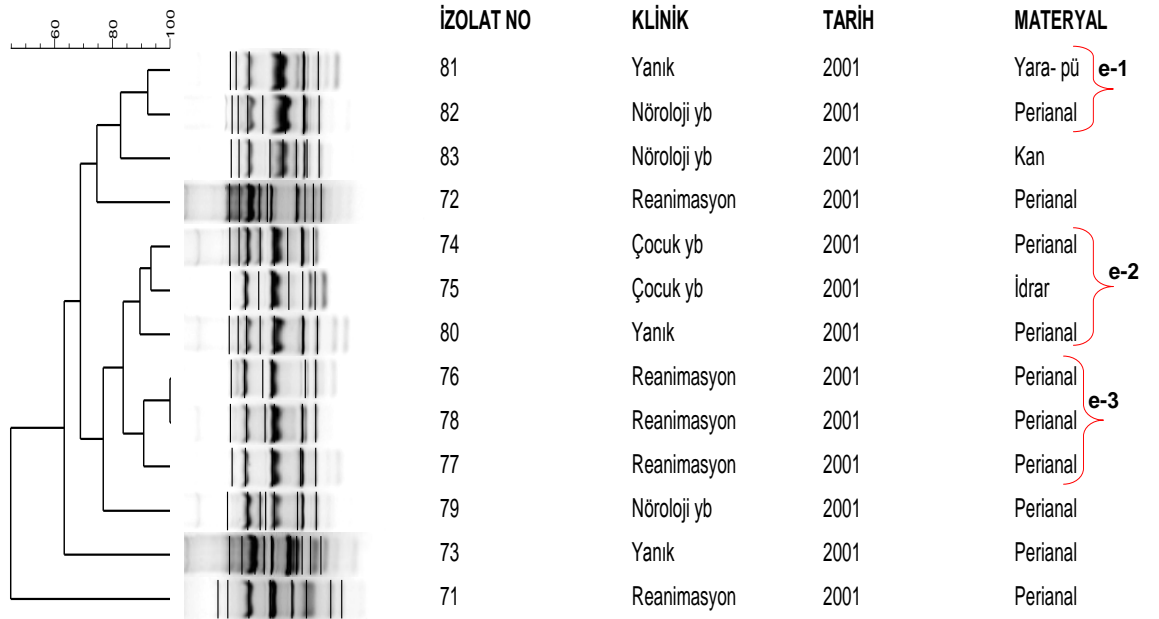
Şekil-20: Grup5'teki 13 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.

Grup 5 içindeki 13 VR *E. faecium* suşuna ait genomik DNA örneklerinin klonal ilişkisinin tespitinde kullanılan AP-PCR ile amplifikasyonu sonucu; molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 100 kb ile 1500 kb arasında değişen büyüklükte, 5-10 banttıan oluşan bir profil elde edildi (Şekil-21).

Bionumerics yazılım programı ile AP-PCR bant profillerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen dendrogramlara göre; 2 izolattın bulunduğu e-1 ile 3'er izolattın bulunduğu e-2, e-3 klon kümeleri ve bu kümelerin dışında kalan 5 farklı izolat olduğu tespit edildi (Şekil-22).



Şekil-21: Grup5'teki 13 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen jel görüntüsü



Şekil-22: Grup5'teki 13 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen dendrogramı.

Tüm gruplarda, 9 yıllık zaman diliminde VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 83 *E. faecium* suşunun PFGE yöntemi ile bir arada değerlendirilmesi sonucu; suşların 11 farklı klonal küme içinde toplandığı, 2'şer izolatin bulunduğu F-3 ile F-7, 3'er izolatin bulunduğu F-8, F-10 ile F-11, 4'er izolatin bulunduğu F-6 ile F-9, 5 izolatin bulunduğu F-4, 9 izolatin bulunduğu F-5, 16 izolatin bulunduğu F-1, 26 izolatin olduğu F-2 ve bu klonal kümelerin dışında kalan 6 izolat olduğu tespit edildi.

Bu kümelerden en büyüğü olan F-2 klonal kümede; tümü grup-1 içinde değerlendirilen 2009 yılına ait 26 izolatin olduğu, diğer yıllara ait izolatların yer almadığı, F-1 ve F-3 klon kümelerine ise %84 benzerlik gösterdiği görüldü.

Diğer bir klonal küme olan F-1'in ise; grup-4 içinde değerlendirilen 2002 yılına ait 10 izolat ile grup-5 içinde değerlendirilen 2001 yılına ait 6 izolattan oluştuğu, bu küme içindeki suşların aralarında en az %86 benzerlik gösterdiği görüldü.

Nozokomiyal enfeksiyon tanısı almış ve birden fazla klinik materyalinde üremesi olan 18 hastanın farklı örneklerinden izole edilen 38 suşun PFGE yöntemiyle karşılaştırılması sonucu; 15 hastanın farklı klinik materyallerinden izole edilen 32 suşun kendi aralarında aynı klonal kümede toplandığı tespit edildi. Buna göre; 9, 10 ile 11 nolu izolatların Reanimasyon Ünitesinde yatan bir hastanın sırasıyla perianal sürüntü, kateter ve kan örneğinden izole edildikleri, F-2 klonal kümede yer aldıkları ve %100 uyumlu oldukları tespit edildi. Aynı şekilde 15 ile 16, 20 ile 21, 22 ile 23, 25 ile 26 nolu izolatların F-2 klonal kümede toplandığı ve kendi aralarında %100 uyumlu oldukları görüldü. Ayrıca 34 ile 35 nolu izolatlar F-6 klonal kümede ve %100 uyumlu, 42 ile 43 nolu izolatlar F-4 klonal kümede ve %100 uyumlu, 44 ile 45 nolu izolatlar F-5 klonal kümede ve en az %90 uyumlu, 56 ile 57 nolu izolatlar F-10 klonal kümede ve %100 uyumlu, 61 ile 62 nolu izolatlar F-1 klonal kümede ve en az %90 uyumlu, 63 ile 64 nolu izolatlar F-1 klonal kümede ve en az %90 uyumlu, 66, 67 ile 68 nolu izolatlar F-1 klonal kümede ve en az %86 uyumlu, 69 ile 70 nolu izolatlar F-1 klonal kümede ve %100 uyumlu, 74

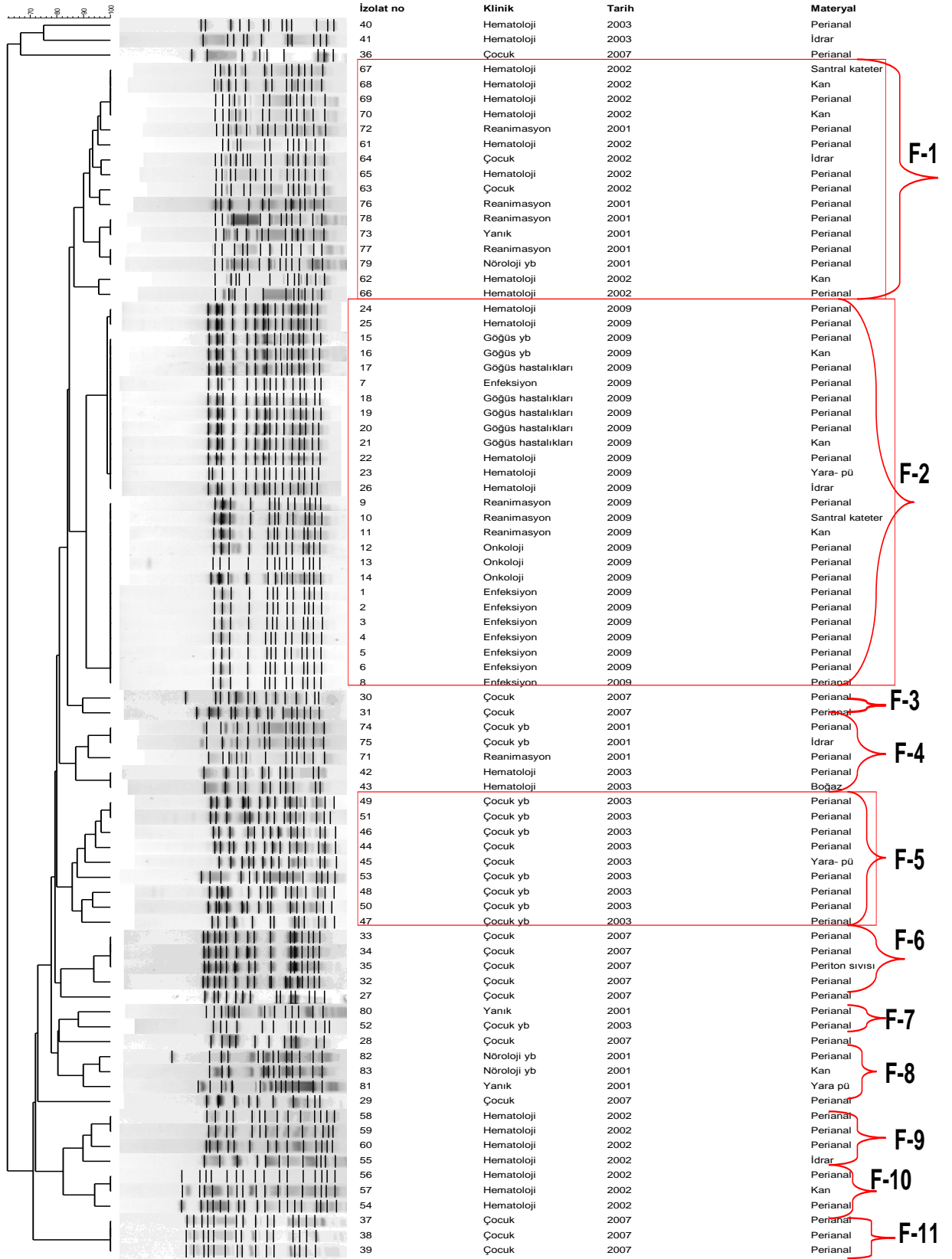
ile 75 nolu izolatlar F-4 klonal kümede ve %100 uyumlu, 82 ile 83 nolu izolatlar F-8 klonal kümede ve en az %94 uyumlu olarak tespit edildi.

Nozokomiyal enfeksiyon tanısı almış 3 hastanın ise farklı örneklerinden izole edilen 6 suşun kendi aralarında farklı kümelerde toplandığı görüldü. Buna göre; 54 ile 55 nolu izolatlar sırasıyla F-10 ve F-9 klonal kümelerde, 80 ile 81 nolu izolatlar sırasıyla F-7 ve F-8 klonal kümelerde yer alırken 40 ile 41 nolu izolatların ise bu 11 kümenin dışında ve kendi aralarında da farklı oldukları tespit edildi (Şekil-23).

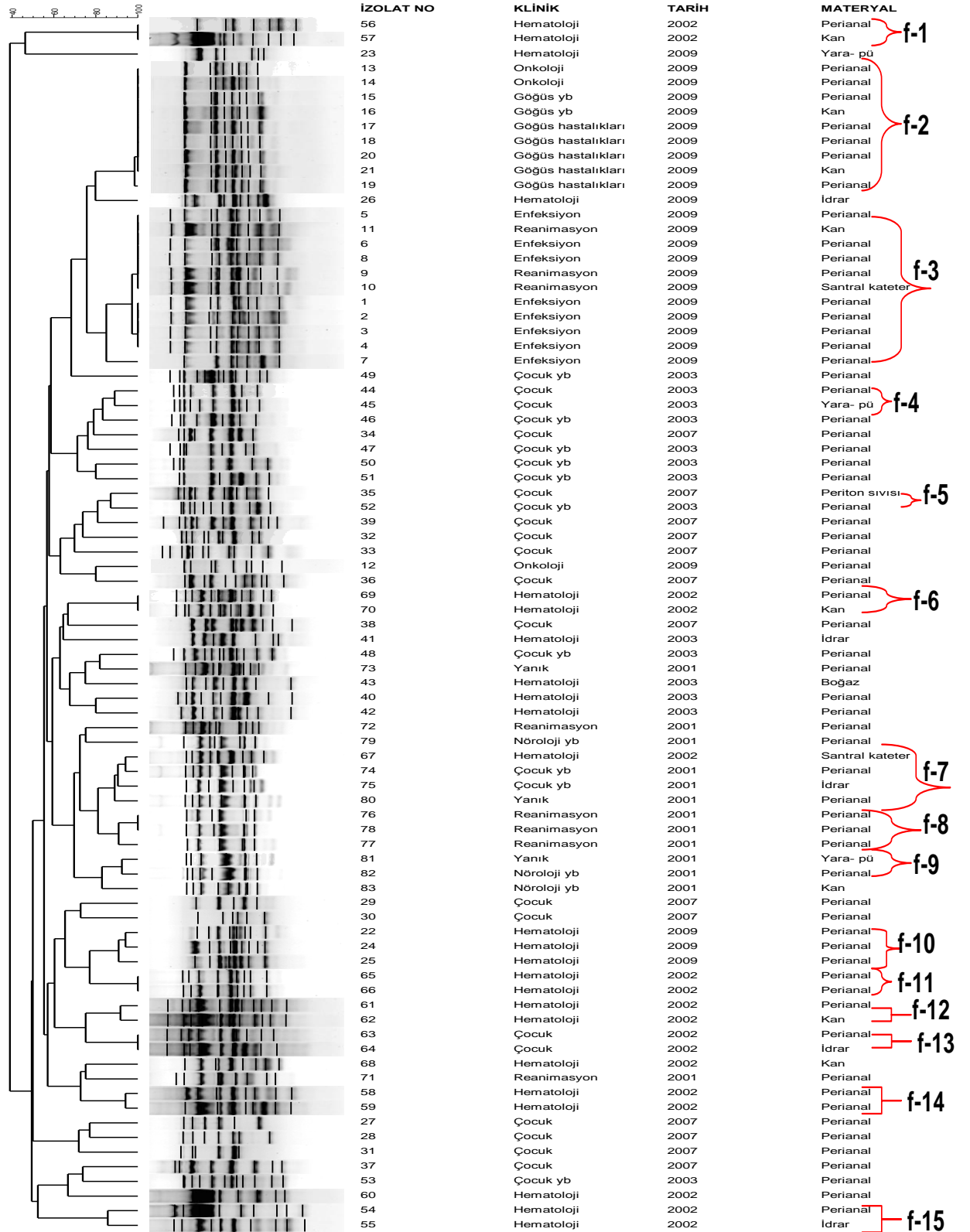
Toplam 83 *E. faecium* suşunun AP-PCR yöntemi ile bir arada değerlendirilmesi sonucunda ise; suşların 15 klonal küme içinde yer aldığı, 2'şer izolatın bulunduğu f-1, f-4, f-5, f-6, f-9, f-11, f-12, f-13, f-14 ile f-15, 3'er izolatın bulunduğu f-8 ile f-10, 4 izolatın bulunduğu f-7, 9 izolatın bulunduğu f-2, 11 izolatın bulunduğu f-3 ve bu klonal kümelerin dışında kalan 33 izolat olduğu tespit edildi.

Bu kümelerin en büyüğü olan f-3 klonal kümede; tümü grup-1 içinde değerlendirilen 2009 yılına ait 11 izolatın olduğu, diğer yıllara ait izolatların yer almadığı görüldü. İkinci büyük küme olan f-2 klonal kümede de yine tamamı 2009 yılına ait 9 izolat olduğu tespit edildi. AP-PCR yöntemiyle 2009 yılına ait geriye kalan 6 izolatın 3'ü f-10 klonal kümede toplanırken 3 izolatın ise bu kümelerin dışında kaldığı tespit edildi (Şekil-24). Oysa PFGE yönteminde bu 26 izolatın hepsi tek klonal kümede (F-2) toplanmıştı (Şekil-23).

Nozokomiyal enfeksiyon tanısı almış 18 hastanın farklı örneklerinden izole edilen 38 suş AP-PCR yöntemiyle karşılaştırıldığında ise; 10 hastanın farklı klinik materyallerinden izole edilen 21 suşun kendi aralarında aynı kümede toplandığı ancak 8 hastadan izole edilen 17 suşun kendi aralarında farklı kümelerde toplandığı görüldü (Şekil-24).



Şekil-23: Toplam 83 VRE suşunun PFGE ile elde edilen dendrogramı.



Şekil-24: Toplam 83 VRE suşunun AP-PCR ile elde edilen dendrogramı.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Vankomisin direnci özellikle hastanede yatan hastalarda önemli bir problemidir. VRE'ler sıklıkla GİS'te kolonize olur. Bu kolonizasyon herhangi bir semptom vermeden çok uzun süre devam edebilir. VRE kolonizasyonu gerek endojen yolla enfeksiyon gelişiminde, gerekse ekzojen yolla diğer hastalara geçişte rezervuar olarak rol oynar. VRE'ler nozokomiyal epidemilere yol açarak mortalite ve morbiditeyi artırabilir. Bu nedenle kolonizasyonunun yayılmasını engellemek ve kolonize hastalarda enfeksiyonu önlemek oldukça önemlidir. VRE riski olan birimlerde periyodik perianal sürüntü örneklerinin alınması VRE kolonizasyonunun tespitinde önerilmektedir (87).

Avrupa ülkelerinde 1988 yılında, ABD'de de 1989 yılından itibaren bildirilmeye başlanan VRE suşları daha sonra bir çok ülkeden bildirilmiştir. Farklı ülkelerde VRE suşlarıyla oluşan enfeksiyonların epidemiyolojik özellikleri ve önlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda hem hastane hem de toplum kökenli VRE suşlarında direncin kaynağı, glikopeptit grubu antibiyotiklere karşı direncin mekanizması, transfer edilebilir genetik elemanlar ve kromozomal mutasyonlar büyük ölçüde tanımlanmıştır (6).

Enterokok türleri arasında klinik öneme sahip olan VRE'lerin tür dağılımı birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Enfeksiyonun lokalizasyonu, hastanın takip edildiği klinik, hastanede antibiyotik kullanım politikaları gibi faktörlere bağlı olarak, gerek hastanelerde gerekse bölgeler arasında izole edilen VRE türleri değişiklikler gösterebilmektedir. Ancak tüm dünyada hem hastane enfeksiyonlarında hem de kolonizasyonla ilişkili olarak izole edilen VRE türleri arasında *E. faecium* oranının giderek arttığı ve yüksek düzey glikopeptit direncinin yayılmasından sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

Kanada'da hastane enfeksiyonları süveyans programına göre üriner sistem enfeksiyonları ve bakteriyemilerden izole edilen VRE izolatlarının

neredeyse tamamının (%98,3) *E. faecium*, geriye kalan %1,7'sinin de *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir (88).

Rudy ve ark. (89) tarafından yapılan epidemiyolojik bir çalışmada 1995-2002 yılları arasında izole edilen VRE izolatları incelenmiştir. Uzun süreli epidemiyolojik çalışmada VRE'lerin glikopeptit türevi antibiyotiklere karşı direnç oranları ve türler arasındaki farklılıkların tespitinin amaçlandığı bu çalışmada *E. faecium* suşlarında, *E. faecalis*'e göre çok belirgin bir direnç artışı olduğunu tespit edilmiştir.

Ülkemizde ise Aygün ve ark. (90) tarafından Ankara ve İstanbul'da yapılan çalışmalarda 467 hasta değerlendirilmiş ve VRE kolonizasyon oranı %1,9 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada izole edilen VRE'lerin tamamının vankomisin ve teikoplanine dirençli *E. faecium* olduğu tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda; Ocak 2001 ile Aralık 2009 yılları arasında 9 yıllık periyot içinde hastanede yatan 257 farklı hastadan alınan örneklerden izole edilen toplam 664 VRE suşu olduğu belirlendi. Bu suşların türlere göre dağılımına baktıldığında 651 (%98)'inin VR *E. faecium* suşu olduğu tespit edildi. Çalışmamıza dahil ettiğimiz muhtemel epidemik dönemlerinde izole edilen 83 adet *E. faecium* suşu incelendiğinde ise tüm izolatların yüksek düzey glikopeptid direncine sahip olduğu, E-test yöntemi ile 83 *E. faecium* izolatının hepsinde vankomisin MİK değerinin 256 µg/ml'nin üzerinde, teikoplanin MİK değerinin 16 µg/ml'nin üzerinde olduğu tespit edildi (Tablo-7). Tüm dünyada VRE izolatları arasında baskın tür olarak tespit edilen VR *E. faecium*'un bizim hastanemizde de benzer şekilde en sık izole edilen tür olduğu belirlendi.

Hastane kökenli VRE salgınlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespiti için salgınlarda izole edilen suşların tür ve direnç özellikleri belirlendikten sonra mutlaka moleküler epidemiyolojik yöntemlerle incelenmeleri gerekmektedir. Genotipik yöntemlerle tür içi izolatlar arasındaki klonal ilişkinin gösterilmesi son derece önemlidir. Günümüze kadar özellikle VRE salgınlarının epidemiyolojik özelliklerinin tespitinde, fenotipik yöntemlerin dışında, farklı moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan PFGE yönteminin tekrarlanabilirliğinin iyi ve ayırım gücünün yüksek olması

nedeniyle “altın standart” olarak kabul edilmiştir. Kullanılan diğer moleküler testler PFGE yöntemine göre derecelendirilmiştir. PFGE yöntemi farklı bakterilerle oluşan nozokomiyal salgınlarda, özellikle de kısa süreli salgınlarda, salgın suşları ve kaynak tespitinde son derece yararlı bulunmuştur. Bununla birlikte uzun süreli sürveyans çalışmaları için de PFGE yönteminin kullanılabilir sonuçlar ürettiğini ileri süren çalışmalar mevcuttur.

Cheng ve ark. (91) tarafından yapılan bir çalışmada Hong Kong’da, üçüncü basamak bir hastanenin Beyin Cerrahi Klinik ve Yoğun Bakım Ünitesinde, bir aylık periyotta görülen VR *E. faecium* salgını araştırılmıştır. İlk VRE suşu izole edildikten sonraki bir ay süresince temas takipleri yapılmış ve 211 hastadan 193 klinik örnek toplanmış, çevresel kontaminasyonun derecesini görebilmek için de 516 çevre kültürü alınmıştır. Çalışmada indeks olgu ile birlikte 4 hasta örneğinde ve 2 tane de çevre kültüründe olmak üzere toplam 6 VR *E. faecium* suşu izole edilmiş ve tüm suşların vankomisin MİK değeri E-test yöntemi ile 256 µg/ml’nin üzerinde bulunmuştur. PFGE yöntemi ile bu 6 suşun aynı bant profiline sahip olduğu tespit edilmiş ve bu suşlar dışında örneklerden VRE izole edilmemiştir. Araştırmacılar, bulaş oranındaki düşüklüğü ise bu birimlerde VRE’ye karşı alınan hijyen tedbirlerine bağlamışlar ve PFGE ile klonal ilişkilendirmenin salgın sürveyansı için önemini vurgulamışlardır.

Alves D’azevedo ve ark. (92) tarafından Brezilya’da bir eğitim hastanesinde yapılan bir çalışmada, ilk defa izole edilmesinden itibaren 8 yıl boyunca VRE suşlarının fenotipik ve genotipik özellikleri araştırılmış. Şubat 2006’da aynı hastanenin farklı Yoğun Bakım Ünitelerinde takip edilen hastalardan 81 adet rektal sürüntü örneği alınmış ve 20’sinde *E. faecium*, 17’sinde de *E. faecalis* olmak üzere toplam 37 örnekte VRE izole edilmiştir. İzolatların tamamının glikopeptidlere yüksek düzeyde dirençli olduğu, PFGE yöntemi ile *E. faecalis* izolatlarının 2, *E. faecium* izolatlarının ise 5 farklı klonal küme içerisinde toplandığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar aynı klonal küme içerisinde yer alan *E. faecium* izolatlarının, 4 farklı Yoğun Bakım Ünitesinde takip edilen, 4 farklı hastadan izole edildiğini bildirmişler ve bu klonun sekiz yıl önce tespit ettikleri ilk VRE klonundan farklı olduğunu

belirterek, hastaneye yeni bir VR *E. faecium* klonunun yerleştiğini ispatlamışlardır. Bu çalışmada sonuç olarak PFGE yönteminin kısa süreli sürveyans çalışmalarında olduğu kadar, uzun süreli sürveyans için de önemli olduğu vurgulanmıştır.

Corso ve ark. (93) yaptıkları çalışmada 1997-2000 yılları arasında Arjantin'de 30 farklı hastaneden izole edilen 189 VR *E. faecium* suşunun glikopeptit direnç mekanizmalarını ve PFGE yöntemi ile genetik ilişkilerini araştırmışlar. Çalışmada PFGE yöntemi ile tüm suşların 35 farklı klonal kümede toplandığı, 106 (%56) suşun en büyük küme olan Tip1 klonal kümeyi oluşturduğu gösterilmiştir. Aynı klonal kümede yer alan bu suşların, 30 hastanenin 19'unda bulunduğu, 17 hastanede ise baskın suş olduğu belirlenmiş. Ayrıca Tip1 klonunun, aynı hastanenin farklı kliniklerinde, aynı şehrin farklı hastanelerinde ve farklı şehirlerdeki hastanelerde bulunan yerleşik suş olduğu kabul edilmiştir. Aynı küme içerisinde yer alan, ancak PFGE'de bant profillerindeki küçük değişikliklere bağlı olarak farklı alt kümeler oluştuğu tespit edilmiş. Bant profilindeki bu minör değişikliklerin ise enterokoklardaki çeşitli aktarılabılır genetik elementlerin (plazmid, transpozon, IS elementleri gibi) kazanımı veya kaybı sonucu veya mutasyonlara bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada sonuç olarak PFGE yönteminin hem kısa hem de uzun süreli sürveyans çalışmaları için kullanılabilir sonuçlar ürettiğini vurgulamışlar ve muhtemelen bir epidemik klonun uzun süredir hastanelere hakim olabildiğini ileri sürmüşlerdir.

Valdezate ve ark. (94) yaptıkları çalışmada 10'u hastane enfeksiyonu tanısı almış hasta materyallerinden, 40'ı kolonizasyonla ilişkili örneklerden olmak üzere toplam 50 VR *E. faecium* izolatını klonal ilişki yönünden PFGE, Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) ve Multilokus Sequence Tipleme (MLST) yöntemleri ile değerlendirmişler. çalışmalarında, PFGE yöntemi ile bütün izolatların 3'ü büyük "ana küme" olmak üzere 8 küme içerisinde toplandığı tespit edilmiş, bu 3 major kümeden Tip1'in ilk izole edilen indeks suş ile ilişkili suşları içerdiği ve 2 yıl boyunca 3 servisten izole edilen 37 izolattan oluştuğu bildirilmiştir. Tip 6'nın, 101 gün içerisinde 2 servisteki toplam 5 hastadan izole edildiği ve Tip 7'nin de 7

günlük peryotta aynı servisteki 2 hastadan izole edildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak PFGE yöntemi ile belirlenen grupların hem kısa hem de uzun süreli sürveyans için son derece önemli sonuçlar ürettiğini göstermişlerdir.

Brilliantova ve ark. (95) yaptıkları çalışmada hematolojik malignitesi olan hastalardan izole edilen 129 VR *E. faecium* suşunun klonal ilişkisini değerlendirmiş, PFGE yöntemi ile tümü *vanA* pozitif olan 129 VR *E. faecium* suşunun 23 farklı gen kümesi (A-W) içerisinde yer aldığını göstermişlerdir. Çalışmada en geniş klonal kümelerin, 30 üyeli A (A1-A30) ile 8 üyeli F(F1-F8) kümeleri olduğu bildirilmiş ve PFGE yönteminin VRE sürveyansındaki önemi vurgulanmıştır.

Perlada ve ark. (96) tarafından yapılan bir çalışmada; Şubat 1995'ten Temmuz 1995'e kadar, 6 aylık periyotta, Ohio'da 10 hastanede yatan hastaların kan kültürlerinde izole edilen 157 enterokok suşu incelenmiş, 108 (%69) *E. faecalis*, 46 (%29) *E. faecium* ve 1'er tane *E. avium*, *E. durans*, ve *E. gallinorum* suşu izole edilmiş. Bunlardan 20 adet *E. faecium* ve 1 adet *E. gallinorum* izolatının vankomisine dirençli olduğu belirlenmiş. *VanB* fenotipinde olan 19 *E. faecium* suşunun PFGE yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu tamamının aynı veya çok benzer bant paternlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada Ohio'daki hastanelerde artan vankomisin direncinin temelde tek bir *E. faecium vanB* suşunun klonal diseminasyonuna bağlı olduğunu gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda, 9 yıllık zaman diliminde VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 83 *E. faecium* suşunun PFGE yöntemi ile bir arada değerlendirilmesi sonucu; suşların 11 farklı klonal küme içinde toplandığı tespit edildi. Bu suşların kümelere göre dağılımına bakıldığında; 2'şer izolatın bulunduğu F-3 ile F-7, 3'er izolatın bulunduğu F-8, F-10 ile F-11, 4'er izolatın bulunduğu F-6 ile F-9, 5 izolatın bulunduğu F-4, 9 izolatın bulunduğu F-5, 16 izolatın bulunduğu F-1, 26 izolatın olduğu F-2 ve bu klonal kümelerin dışında kalan 6 izolat olduğu tespit edildi.

PFGE yöntemi ile bu klonal kümelere en büyüğü olan F-2'de; tümü grup-1 içinde değerlendirilen 2009 yılına ait 26 izolatın olduğu, diğer yıllara ait izolatların yer almadığı tespit edildi. Ayrıca bu 26 izolatın 13'ü kendi

aralarında %100 uyumlu iken diğer 13 izolat da yine kendi aralarında %100 uyumlu bulundu. Bu izolatların tümü aralarında en az %92 benzerlik gösteren tek klonal kümede toplandı (Şekil-23). 2009 yılındaki epidemide izole edilen bu F-2 klonunun, hastanemizin farklı Klinik ve Yoğun Bakım Ünitelerinde hakim tek klon olduğu belirlendi. Alves D'azevedo ve ark. (95) yaptıkları çalışmadakine benzer şekilde, bizdeki F-2 klonunun önceki yıllarda izole edilen klonal suşlardan farklı olduğu, hastanemizin genelinde tek klonun disseminasyonu sonucu daha önceki suşların yerini aldığı ve baskın hale geldiği tespit edildi.

Diğer bir klonal küme olan F-1'in ise; grup-4 içinde değerlendirilen 2002 yılına ait 10 izolat ile grup-5 içinde değerlendirilen 2001 yılına ait 6 izolat olmak üzere toplam 16 izolattan oluştuğu, bu küme içindeki suşların aralarında en az %86 benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil-23). 2001 yılında Reanimasyon, Yanık ve Nöroloji Yoğun Bakım Ünitelerinde takip edilen 6 hasta örneğinde izole edilen bu klonun, 2002 yılında Çocuk ve Hematoloji Kliniğinde takip edilen 10 hasta örneğinde izole edilmesi, F-1 klonunun uzun süre varlığını sürdürdüğünü, bu iki epidemide baskın klon olduğunu göstermektedir.

2002 yılındaki epidemiden çalışmaya dahil edilen ve genel değerlendirmede F-1 klonal kümeden farklılık gösteren diğer 7 izolat ise, 4 izolatlı F-9 ile 3 izolatlı F-10 klonal kümelerini oluşturdu. F-9 ve F-10 klonları da tamamı Hematoloji Kliniğinde yatan hasta örneklerinden izole edildi. F-9 ve F-10 klonları arasında %82 benzerlik varken, bu iki klonun F-1 klonundan oldukça farklı olduğu tespit edildi (Şekil-23).

2003 yılındaki epidemiden çalışmaya dahil edilen 14 izolat'ın PFGE ile değerlendirilmesi sonucu; 9 izolatın bu dönemdeki en büyük küme olan F-5'te, 2 izolatın F-4'te, 1 izolatın F-7'de toplandığı ve 2 izolatın ise bu kümelerin dışında, tamamen farklı oldukları tespit edildi. Bu farklı 2 izolat Hematoloji Kliniğinde yatan bir hastanın sırasıyla perianal ve idrar örneklerinden izole edilmişti. Tüm izolatların Çocuk Klinik ve Yoğun Bakım Ünitesinden izole edildiği F-5 klonunun, bu epidemideki baskın klon olduğu belirlendi.

F-4 klonal kümede; 2001 yılında Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde yatan bir hastanın 2 farklı örneğinden, Reanimasyon Ünitesinde yatan 1 hasta örneğinden izole edilen 3 izolat ile 2003 yılında Hematoloji Kliniğinde yatan bir hastanın 2 farklı örneğinden izole edilen 5 izolatın toplandığı, yine F-7 klonal kümede de 2001 yılında Yanık ünitesinde yatan 1 hasta örneğinden ve 2003 yılında Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde yatan 1 hasta örneğinden izole edilen 2 izolatın toplandığı görüldü (Şekil-23). F-4 ve F-7 klonlarının 2001 ve 2003 yıllarında farklı kliniklerde yatan, az sayıdaki hasta örneğinden izole edilmesi, bu klonların uzun süre varlığını sürdürdüğünü düşündürmekle birlikte, aynı türün içindeki sınırlı sayıdaki mutasyonlara bağlı olarak, farklı klonların benzerliği şeklinde de yorumlanabilir.

2007 yılındaki epidemiden çalışmaya dahil edilen, tümü Çocuk Kliniğinde yatan hasta örneklerinden izole edilen 13 izolat'ın PFGE ile değerlendirildiği genel dendrogramda; 4 izolatın F-6, 3 izolatın F-11 klonal kümede toplandığı, diğer epidemide izole edilen suşlara benzemeyen ve kendi içinde de farklı olan izolatların olduğu tespit edildi. F-6 klonal kümede yer alan 2 izolat, aynı hastanın sırasıyla perianal sürüntü ve periton sıvısından izole edildi ve %100 uyumlu bulundu. Aynı kümedeki farklı bir hastanın perianal sürüntü kültüründen izole edilen üçüncü bir izolat da yine bu 2 izolatla %100 uyumlu bulundu (Şekil-23). Ancak bu epidemide baskın bir klondan ziyade farklı bir çok klonal suşun hasta örneklerinden izole edildiği tespit edildi.

Enterokokların etken olduğu enfeksiyonların genellikle hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen enfeksiyonlar şeklinde oluştuğu düşünülmekle birlikte, ekzojen yolla da enfeksiyona neden olabileceği gösterilmiştir. Özellikle antibiyotiklere dirençli türler, hastadan hastaya veya kolonize hastane personeli tarafından hastalara bulaştırılabilmektedir. Böylece gerek hastane içinde, gerekse hastaneler arası bu suşların yayılarak salgınlara sebep olabileceği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (1, 5). Perianal sürüntü örneklerinde VRE izole edilmesi hastanın GİS kolonizasyonunu gösterir.

Çalışmamızda perianal sürüntü örneğinde VRE izole edilen, kolonize olduğunu bildiğimiz 18 hastanın takip eden zamanda farklı klinik materyallerinde de VRE izole edildiğini belirledik. 18 tanesi perianal sürüntü örneklerinden, 20 tanesi diğer klinik materyallerden izole edilen (Tablo-6) bu 38 suş kendi aralarında karşılaştırıldı. Yani bu hastaların kolonize oldukları VRE suşları ile nozokomiyal enfeksiyona sebep olan VRE suşlarının aynı olup olmadığı değerlendirildi. Buna göre;

PFGE yöntemi ile Grup 1 içinde değerlendirilen 2009 yılı izolatlarından 9, 10 ile 11 nolu izolatların Reanimasyon Ünitesinde yatan bir hastanın sırasıyla perianal sürüntü, kateter ve kan örneğinden, 15 ile 16 nolu izolatların Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesinde yatan bir hastanın perianal sürüntü ve kan örneğinden, 20 ile 21 nolu izolatların yine Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesinde yatan ayrı bir hastanın perianal sürüntü ve kan örneğinden, 22 ile 23 nolu izolatların Hematoloji Kliniğinde yatan bir hastanın perianal sürüntü ve yara/pü örneğinden, 25 ile 26 nolu izolatların yine Hematoloji Kliniğinde yatan ayrı bir hastanın perianal sürüntü ve idrar örneğinden izole edildiği, bu suşların kendi aralarında %100 benzer olduğu tespit edildi (Şekil-4). Klinik materyallerden izole edilen VRE suşlarının, hastaların kolonize oldukları suşlarla aynı olması, öncelikle endojen yayılımı düşündürmekle birlikte 2009 yılı suşlarının tek kümede toplanması, ekzojen yolla da bulaş olabileceğini gösterdi. Bu nedenle bu grup için endojen-ekzojen bulaş ayrımı yapılamadı.

Grup 2 içinde değerlendirilen 2007 yılı izolatlarından 34 ile 35 nolu izolatlar Çocuk Kliniğinde yatan bir hastanın sırasıyla perianal sürüntü ve periton sıvısından izole edildi. Bu iki suş %100 benzer bulundu. Ayrıca daha sonra aynı kliniğe yatırılarak takip edilen başka bir hastanın da perianal sürüntü örneğinde izole edilen bir suşla (33 nolu izolat) yine bu iki suş %100 benzer iken diğer tüm suşlarla tamamen farklı oldukları tespit edildi (Şekil-8). İlk hastada izole edilen suşun muhtemelen kendi florasından endojen bulaş yoluyla nozokomiyal enfeksiyona, ekzojen yolla da diğer hastaya bulaşarak kolonizasyonuna neden olduğu düşünüldü.

Grup 3 içinde değerlendirilen 2003 yılı izolatlarından 40 ile 41 nolu izolatların Hematoloji Kliniğinde yatan bir hastanın sırasıyla perianal sürüntü ve idrar örneğinden, 42 ile 43 nolu izolatların yine Hematoloji Kliniğinde yatan ayrı bir hastanın perianal sürüntü ve boğaz örneğinden, 44 ile 45 nolu izolatların Çocuk Kliniğinde yatan bir hastanın sırasıyla perianal sürüntü ve idrar örneğinden izole edildi (Şekil-12). 42 ile 43 nolu izolatların kendi aralarında %100 benzer olması ve diğer izolatlardan tamamen farklı olması muhtemel bir endojen bulaşı göstermektedir. 40 ile 41 nolu izolatların hem kendi aralarında hem de diğer izolatlarla farklı olması ekzojen bulaşı düşündürdü. 44 ile 45 nolu izolatların ise hem kendi aralarında hem de Çocuk Kliniğinde yatan diğer 8 hastayla benzer olması nedeniyle endojen-ekzojen bulaş ayrımı yapılamadı.

Grup 4 içinde değerlendirilen 2002 yılı izolatlarından 54 ile 55 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve idrar) farklı, 56 ile 57 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve kan) %100 benzer, 61 ile 62 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve kan) %90 benzer, 63 ile 64 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve idrar) %90 benzer, 66, 67 ile 68 nolu izolatlar (perianal sürüntü, santral kateter ve kan) en az %86 benzer, 69 ile 70 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve kan) %100 benzer bulundu (Şekil-16). Bu hasta grubunda 56 ile 57 nolu izolatlar kendi aralarında %100 uyumlu iken diğer izolatlardan tamamen farklı olmaları endojen bulaşı, 54 ile 55 nolu izolatların ise kendi aralarında farklı olması ekzojen bulaşı desteklemektedir. Diğer hastalarda, farklı hastalardaki izolatların benzerliği nedeniyle endojen-ekzojen bulaş ayrımı yapılamadı.

Grup 5 içinde değerlendirilen 2001 yılı izolatlarından ise 74 ile 75 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve idrar) %100 benzer iken, 80 ile 81 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve yara/pü) farklı, 82 ile 83 nolu izolatlar (perianal sürüntü ve kan) en az %94 benzer olarak tespit edildi (Şekil-20). 82 ile 83 nolu izolatların aynı olması endojen, 80 ile 81 nolu izolatların farklı olması ise ekzojen bulaşı desteklemektedir. 74 ile 75 nolu izolatlar aynı iken diğer bazı farklı hastalardaki izolatlarla benzerlik göstermesi nedeniyle endojen-ekzojen bulaş ayrımı bu izolatlar için yapılamadı.

Sonuç olarak endojen veya ekzojen yolla, 18 hastada nozokomiyal enfeksiyon gelişmesi ve bu hasta grubunun çoğunda kolonize oldukları suş ile aynı suşun klinik materyallerden izole edilmesi, VRE ile kolonizasyonunun önemini göstermektedir. Çalışmamızda endojen ve ekzojen bulaşı düşündürülen hastalar olmakla birlikte bu ayırım tüm suşlar için yapılamadı.

Yüksek ayırım gücüne sahip olan moleküler epidemiyolojik yöntemlerin sürveyans çalışmalarında kullanılmaya başladığı dönemlerde, gerek nükleik asit amplifikasyon temeline dayalı, gerekse restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı çok sayıda yöntem denenmiş ve PFGE yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Bu yöntemler arasında nispeten daha basit, ucuz ve hızlı olan, ancak tekrarlanabilirliği düşük bir yöntem olan AP-PCR yöntemi birçok araştırmacı tarafından farklı bakterilerin incelenmesinde kullanılmıştır. VRE sürveyansında da yine AP-PCR'in alternatif bir yöntem olarak denendiği çalışmalar yapılmış ve sonuçları tartışılmıştır.

Braak ve ark. (97) tarafından yapılan bir çalışmada; 100 VRE izolatu değerlendirilmiş, bu izolatların genotipik ilişkilerini belirlemede kullandıkları PFGE ve AP-PCR yöntemleri karşılaştırılmıştır. *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinorum*, *E. avium* ve *E. casseliflavus* türlerinden oluşan, Hollanda'dan 50, İngiltere'den de 50 izolat olmak üzere toplam 100 izolatın PFGE ve AP-PCR yöntemleri ile değerlendirildiği bu çalışmada, her iki yöntemle de elde edilen sonuçlar birbirine benzer bulunmuş. Çalışmada her iki yöntemin de birbirleri için iyi birer alternatif olduğu vurgulanmıştır.

Diğer taraftan Barbier ve ark. (98) tarafından yapılan çalışmada; 40 aylık bir periyotta, hastanede yatan hastalardan izole edilen 60 VR *E. faecium* izolatu değerlendirilmiş, PFGE ve AP-PCR yöntemleri kullanılarak sonuçları karşılaştırılmıştır. AP-PCR yönteminin PFGE yöntemine göre daha düşük ayırım gücüne sahip olduğu, ancak hastane kökenli VRE sürveyansında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Vancouver ve ark. (11) yaptıkları çalışmada; farklı Avrupa ülkelerinde insan, hayvan ve besin gibi çeşitli kaynaklardan izole edilen vankomisine duyarlı ve dirençli 78 *E. faecium* izolatu PFGE, AP-PCR ve Amplified fragment length polymorphism (AFLP) yöntemleri ile

değerlendirilmiş, AP-PCR yönteminin tekrarlanabilirliği, PFGE yöntemine göre oldukça düşük bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda, 9 yıllık zaman diliminde VRE suşlarından seçilerek çalışmaya dahil edilen 83 *E. faecium* suşunun AP-PCR yöntemi ile bir arada değerlendirildiği genel dendrogramda; suşların 15 farklı klonal küme içinde toplandığı tespit edildi. Bu suşların kümelere göre dağılımına bakıldığında; 2'şer izolatin bulunduğu f-1, f-4, f-5, f-6, f-9, f-11, f-12, f-13, f-14 ile f-15, 3'er izolatin bulunduğu f-8 ile f-10, 4 izolatin bulunduğu f-7, 9 izolatin bulunduğu f-2, 11 izolatin bulunduğu f-3 ve bu klonal kümelerin dışında kalan, kendi aralarında da tamamen farklı 33 izolat olduğu tespit edildi (Şekil-24). Oysa PFGE yöntemiyle aynı izolatlar değerlendirildiğinde 11 farklı klonal küme içinde toplanmıştı (Şekil-23).

AP-PCR yöntemi ile bu klonal kümelerden en büyüğü olan f-3'de; tümü grup-1 içinde değerlendirilen 2009 yılına ait 11 izolatin olduğu, ikinci büyük küme olan f-2'de; yine 2009 yılına ait 9 izolatin olduğu görüldü. 2009 yılına ait diğer 6 izolatin ise 3'ü f-10 klonal kümede toplanırken, 3 izolat bu kümelerin dışında ve tamamen farklı olarak tespit edildi. AP-PCR yöntemi ile değerlendirilen 2009 yılına ait bu 26 izolat ile daha önceki yıllarda izole edilen izolatlar arasında bir benzerlik tespit edilmedi. PFGE yönteminde de aynı izolatlar ile daha önceki yıllarda izole edilen izolatlar arasında bir benzerlik bulunmadığı ancak izolatların tümünün tek klonal kümede (F-2) yer aldığı belirlendi.

Benzer şekilde diğer 4 epidemi döneminden çalışmaya dahil edilen izolatlar AP-PCR yöntemi ile değerlendirildiğinde, PFGE yöntemine göre izolatların daha fazla kümede toplandığı, PFGE yönteminde aynı küme içine giren bazı izolatların AP-PCR yönteminde farklı kümelerde yer aldığı tespit edildi.

Toplam 5 grupta değerlendirilen 83 VR *E. faecim* suşunun her iki yöntemle değerlendirilmesi sonucunda; AP-PCR ile suşlar 15 farklı klonal küme içinde toplanırken, PFGE ile aynı suşların 11 farklı klonal kümede toplanması, AP-PCR yönteminin daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu göstermiş olmakla birlikte her iki yöntemle oluşan kümelerdeki izolatların

klonal ilişki yönünden benzerlik göstermediği tespit edildi. Yine nozokomiyal enfeksiyon tanısı almış 18 hastanın farklı örneklerinden izole edilen 38 suşun değerlendirilmesi sonucu; kendi aralarında daha çok aynı klonal kümede toplanmasını beklediğimiz bu suşlardan 32 tanesinin PFGE yöntemiyle kendi aralarında aynı klonal kümede toplandığı ve çoğunun da %100 benzer olduğu, ancak AP-PCR yöntemiyle aynı suşlardan 21 tanesinin kendi aralarında aynı kümede toplandığı tespit edildi (Şekil-23 ve 24).

Ayrıca aynı izolatlar, aynı primer ve aynı test koşullarında AP-PCR yöntemi ile çalışma tekrarlandığında gerek bant sayılarında, gerekse oluşan dendrogramlarda farklılıklar oluştuğu tespit edildi. Oysa PFGE yöntemi çalışma tekrarlandığında ilk çalışmadaki ile %100 uyumlu sonuçlar elde edildi. Bu bulgular AP-PCR yönteminin ayırım gücünün yüksek olduğunu, ancak duyarlılık ve özgüllüğünün PFGE yöntemine göre düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca AP-PCR yönteminin tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu, buna karşılık laboratuvarlar arası standardize edilebilen, tekrarlanabilirliği çok iyi, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan PFGE yönteminin salgın sürveyansında güvenilir bilgiler sunan bir moleküler epidemiyolojik yöntem olduğu kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak; Ocak 2001 ile Aralık 2009 yılları arasında 9 yıllık periyot boyunca hastanemizde yatan hasta örneklerinde izole edilen tüm VRE'ler içinde *E. faecium* türünün %98'lik bir oranla baskın tür olduğu, çalışmaya alınan tüm suşların yüksek düzey glikopeptit direnci gösterdiği ve 5 ayrı dönemde epidemiyeye sebep olduğu belirlendi.

Çalışmamızda farklı yıllarda meydana gelen epidemiyelerde izole edilen 83 VR *E. faecium* suşunun klonal ilişkileri PFGE ve AP-PCR yöntemleri ile tespit edildi. Suşların genotiplendirilmesinde "altın standart" yöntem olarak bilinen PFGE ile değerlendirilmesi sonucu; sadece 2001 ile 2002 yılı epidemilerinde izole edilen birçok suş arasında anlamlı benzerlik olması, bu klonun varlığını uzun süre koruduğunu ve bu iki epidemiyede hastanede baskın hale geldiğini göstermektedir. Diğer 3 epidemiyelerde izole edilen suşlar arasında anlamlı bir benzerlik tespit edilmedi. Ancak aynı epidemiyelerde izole edilen suşların kendi

aralarında birbirlerine benzediği ve birkaç klonal kümede toplandığı belirlendi. Özellikle 2009 yılındaki epidemide tüm suşların tek bir kümede toplanması, daha önceki dönemlerde hastanede izole edilmeyen bu klonun, disseminasyon sonucu tüm hastaneye yayıldığını ve bu epidemiden sorumlu tek klon olduğunu göstermiştir.

Bu bulgular doğrultusunda; nozokomiyal enfeksiyonlar için gerek sağlık çalışanlarını, gerekse hasta ve hasta yakınlarını kapsayan önleyici rehberler düzenlenmeli ve bu rehberlere uyulması konusunda eğitim çalışmaları yapılmalıdır. Ayrıca VRE gibi nozokomiyal enfeksiyon etkenlerine yönelik aktif sürveyans yapılmalıdır. Bu sürveyans sırasında mikrobiyoloji laboratuvarları daha etkin bir şekilde kullanılmalı ve antibiyotik kullanım politikaları gözden geçirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Moellering RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1173-8.
2. Huycke M, Sahm D, Gilmore M. Multiple drug resistant *Enterococci*: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:239-49.
3. Lewis CM , Zervos MJ. Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:111-7.
4. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:686-707.
5. Herwaldt LA, Wenzel RP (eds). Dynamics of hospital-acquired infection. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th edition. Washington DC: American Society for Microbiology;1995.169-81.
6. Torun MM, Altinkum SM, Bahar H, et al. Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Kökenlerinde Genotipik ve Fenotipik Özelliklerin Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005; 35:153-8.
7. Chou YY, Lin TY, Lin JC, et al. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2008; 41:124-9.
8. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470-85.
9. Werner G, Coque TM, Hemmerum AM, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 2008; 13:1-11.
10. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:512-30.
11. Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, et al. Intraspecies GenoMıC Groups in *Enterococcus faecium* and Their Correlation with Origin and Pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:1381-91.
12. Descheemaeker P, Lammens C, Pot B, Vandamme P, Goossens H. Evaluation of Arbitrarily Primed PCR Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Large GenoMicDNA Fragments for Identification of *Enterococci* Important in Human Medicine. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:555-61.
13. Saeed B, Hallgren A, Jonasson J, et al. Modified pulsed field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* 2002; 110:869-74.
14. Facklam RR, Teixeria LM. *Enterococcus*. In: Collier L, Bolows A, Sussman (eds). *Topley&Wilson's Microbiology and Microbial infections*. Vol 2. 9th edition. London: Edvard Arnold Press; 1998. 669-82.

15. Gültekin M. Enterokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenez. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi 2004; 121-40.
16. Bilström H. Molecular epidemiology of clinical *E. faecium* (Thesis). Stockholm: Carolinska Institutet; 2008.
17. Hijazi N, Elmanama AA, Al-Hindi A. Vancomycin-resistant *enterococci* in fecal samples from hospitalized patients and non-hospitalized individuals in Gaza City. J Public Health 2009; 17:243-9.
18. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009;155: 1749-57.
19. Facklam RR, Sahm DF (eds). *Enterococcus*. Manual of Clinical Microbiology. 6th edition. Washington DC: American Society for Microbiology; 1995. 308-14.
20. Butaye P, Devriese L, Haesenbrouck F, et al. Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. J Clin Microbiol 1998; 36:1907-11.
21. Murray BE. The life and times enterococcus. Clin Microbiol Rev 1990; 3:45-65.
22. Ruoff KL, Maza L, Murtagh MS, et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1990; 28:435-7.
23. Winn W, Stephan A, Janda W, Koneman EW, Procop G (eds). Koneman's Color Atlas and Textbook of diagnostic Microbiology. Baltimore : Lippincott Williams and Wilkins; 2006. 40-643.
24. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. İstanbul: Nobel Kitabevi; 2008. 2060-2.
25. Moellering RC Jr. *Enterococcus* species bovis and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease. 5th edition. London: Churchill Livingstone; 2000. 2147-53.
26. Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. Indian J Med Microbiol 2009; 27:301-5.
27. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, et al. Vancomycin-resistant *E. faecium* bacteriemia: Risk factors for infection. Clin Infect Dis 1995; 20:1120-6.
28. Tailor ANS, Bailey E, Rybak MJ. Enterococcus, an emerging pathogen. Ann Pharmacother 1993; 27:1231-41.
29. Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus Enterococcus: Taxonomy. Prokaryotes 2006; 4:163-74.
30. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship To Endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15:308-20.
31. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 232-5.
32. Coque TM, Willems RJL, Fortu'n J, et al. Population Structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University

- Hospital: Setting the scene for a future increase in vancomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2693-700.
33. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004; 72:6032-9.
 34. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2006; 74:4164-71.
 35. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, Procop G, Woods G (eds). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott Co; 2005. 700-11.
 36. Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli Enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection)* 2009; 23:201-9.
 37. Herman DJ, Gerding DN. Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1-4.
 38. Derbentli Ş. Stafilokok ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri. *Ankem Derg* 1996; 10:211-9.
 39. Moellering RC. Jr. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th edition. London: Churchill Livingstone; 2005. 2414-5.
 40. Klare I, Konstabel Emerging Infectious Diseases C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol* 2003; 88:269-90.
 41. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:37-47.
 42. Marothi YA, Agrihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance—An overview. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23:214-9.
 43. Murray BE. Vancomycin resistant enterococci. *Am J Med* 1997; 101:284-93.
 44. Fontana R, Grossata A, Rossi L, Cheng YR, Satta G. Transition from resistance to hypersusceptibility to β -lactam antibiotics associated with loss of a lower-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:678-83.
 45. Murray BE, Singh KV, Markowitz SM, et al. Evidence for clonal spread of a single strain of β -lactamase-producing *Enterococcus faecalis* to six hospitals in five states. *J Infect Dis* 1991; 163:780-5.
 46. Markowitz SM, Wells VD, Williams DS, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of β -lactamase producing aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1075-80.
 47. Çınar T, Leblebicioğlu H, Eroğlu C, Sünbül M. Enterokoklarda penisilin aminoglikozid sinerjizminin araştırılması. *Klimik Derg* 1999; 12:39-42.
 48. Kaye D. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch Intern Med* 1982;142:2006-9.

49. Söyletir G, Çerikçioğlu N. Enterokoklar ve infeksiyonları. İnfeksiyon hastalıkları. 1. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 1996. 334-5.
50. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, et al. novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 4:3554-7.
51. Gómez-Gila R, Romero-Gómez MP, García-Ariasa A, et al. Nosocomial outbreak of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* infection in a tertiary care hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65:175-9.
52. French GL. Enterococci and Vancomycin Resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27:75-83.
53. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:21-5.
54. Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1675-7.
55. Malathum K, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resist Updat* 1999; 2:224-43.
56. Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2001;7:183-7.
57. Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. Önemli ve sorunlu gram pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. 141-58.
58. Tambyah PA, Marx JA, Maki DG. Nosocomial infection with vancomycin- dependent enterococci. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1277-81.
59. Lawrence L, Livornese MD, Susan Dias, et al. Hospital acquired Infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann Intern Med* 1992; 117:112-6.
60. Zervos MJ, Terpenning MS, Schaberg DR, et al. High-level aminoglycoside resistant enterococci: Colonization of nursing home and acut care hospital patients. *Arch Intern Med* 1987; 147:1591-4.
61. Zervos MJ, Dembinski S, Mikesell T, Schaberg DR. High-level resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis*: Risk factors and evidence for exogenous acwuation of infection. *J Infect Dis* 1986; 153:1073-83.
62. Çetinkaya Y. Vankomisin dirençli enterokoklar: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora Dergisi* 2000;1:24-33.
63. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2000;31:586-9.
64. Huckabee CM, Huskins WC, Murray PR. predicting clearance of colonization with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by use of weekly surveillance cultures. *J Clin Microbiol* 2009;47:1229-30.

65. Martone WJ. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998; 19:539-45.
66. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States, 1989-993. *MMWR-Morb Mortal Wkly Rep* 1993; 42:597-9.
67. Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* 2001; 1:314-25.
68. Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yuluğ N. Yenidoğanlarda vankomisin dirençli enterokokların fekal taşıyıcılığı. *Ankem Dergisi* 1999; 13:7-11.
69. Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, ve ark. Vankomisine dirençli *E. faecium* suşu. *Ankem Dergisi* 1999; 13:1-5.
70. Başustaoğlu A, Özyurt M, Beyan C ve ark. Kan kültürlerinden izole edilen glikopeptid dirençli *E. faecium* suşu. *Flora* 2000; 5:142-7.
71. Yetkin MA, Ateş Arıca N, Tülek N, Yağcı S, Tekin Koruk S. Vankomisine dirençli enterokok bakteremisi: Olgu sunumu. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2004; 8:310-4.
72. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:529-36.
73. Sood S, Malhotra M, Das-Arti Kapil BK. Enterococcal infections-antimicrobial resistance. *Indian J Med Res* 2008; 128:111-2.
74. Yıldırım M. Enterokoklar ve enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. *Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 2:46-52.
75. Korten V, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. 1497-506.
76. Esen Ş. Enterokokların neden olduğu infeksiyonlar ve tedavi seçenekleri. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (editörler). *Gram pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004. 159-70.
77. Zeana C, Kubin JC, Della-Latta P, Hammer SM. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis successfully managed with linezolid: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2001; 33:477-82.
78. Testa RT, Peterson PF, Jacobus NV, et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of the glycylicylines, a new class of semisynthetic tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:2770-7.
79. Sabol K, Patterson JE, Lewis JS. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:1664-5.
80. Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, et al. In vitro activity of LY333328, an investigational glycopeptide antibiotic, against enterococci and staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2416-9.

81. Bostic GD, Peri LA, Thal LA, Zervos MJ. Comparative in vitro and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30:109-12.
82. Domig JK, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno-and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol* 2003; 88:165-88.
83. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 13:1-46.
84. Center for disease Control and Prevention. Recommendation for preventing spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16:105-13.
85. Garcia-Migura L, Pleydell E, Barnes S, Davies RH, Liebana E. Characterization of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from broiler poultry and pig farms in England and Wales. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3283-9.
86. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG Jr, Sulakvelidze A. Improved pulsedfield gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4242-54.
87. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:13-21.
88. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP) Surveillance for Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) in Patients Hospitalized in Canadian Acute-Care Hospitals Participating in CNISP 2006 Results.
89. Rudy M, Zientara M, Bek T. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. *Pol J Microbiol* 2005; 54:77-80.
90. Aygün H, Memikoğlu OK, Tekeli A, Azap A, Yörük F. Hastanede yatan riskli hasta gruplarında vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunun sürveyansı. *Türk Anest Rean Derg* 2008; 36:168-73.
91. Cheng VCC, Chan JFW, Tai JWM, Ho YY, Li IWS, To KKW, Ho PL. Successful control of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak in a neurosurgical unit at non-endemic region. *Emerging Health Threats Journal* 2009; 2-9.
92. D'azevedo PA, Furtado GHC. Molecular characterization of Vancomycin Resistant Enterococci strains eight years apart from its first isolation in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2008; 50:195-8.
93. Corso AC, Gagetti PS, Rodríguez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccone DF, Galas MF. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis* 2007; 11:69-75.
94. Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecon MA, Ortega M, Coque TM, Garcia M, Saez-Nieto JA. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:17-20.

95. Brilliantova AN, Kliasovaa GA, Mironovaa AV, Tishkovb VI, Novichkovac GA, Bobryninac VO, Sidorenkod SV. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 35:177-81.
96. Perlada DE, Smulian AG, Cushion MT. Molecular Epidemiology and Antibiotic Susceptibility of Enterococci in Cincinnati, Ohio: a Prospective Citywide Survey. *J Clin Microbiol* 1997; 2342-7.
97. Van den Braak N, Power E, Anthony R, et al. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of Sma1 DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 2000;192:45-52.
98. Barbier N, Saulnier P, Chachaty E, Dumontier A, Andremont A. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1096-9.

TEŞEKKÜR

Eğitimimde emeiği bulunan anabilim dalı baŐkanımız Prof. Dr. Safiye Helvacı başta olmak üzere t¼m Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı oğretim ¼yelerine ve çalıŐanlarına, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı oğretim ¼yelerine ve çalıŐanlarına, tezimin oluşumu ve y¼r¼t¼lmesinde b¼y¼k emek ve desteği olan tez danıŐmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. C¼neyt ¼zakın'a, tezimin DNA bant profillerinin analizi aŐamasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Rıza Durmaz, Sayın Vet. Hek. Alper Karag¼z'e, tez çalıŐmalarım sırasındaki destek ve emeklerinden dolayı Dr. Burcu Dalyan Cilo, Sayın Nuran Akg¼l, Sayın Figen Aymak ve Sayın Mehmet Orhan'a, asistanlık eğitimim boyunca kendilerinden çok Őey oğrendiğim ve her zaman desteklerini hissettiğim t¼m teknisyen ve biyolog arkadaŐlarım ve anabilim dalımızın t¼m çalıŐanlarına teşekkür ederim.

Acı tatlı hayatımın her anında beni destekleyen, yanımda olan aileme, verdiği sonsuz sevgi için eŐime, bana ilham kaynağı olan kızımaya sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Faruk

Soyadı : Karakeçili

Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa, 01.01.1976

Eğitimi :

1982-1987 Tekağaç İlkokulu- Şanlıurfa

1987-1990 Cumhuriyet Ortaokulu- Şanlıurfa

1990-1993 Gazi Lisesi- Şanlıurfa

1995-2001 Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi- Trabzon

2002-2006 Sağlık Bakanlığı Ceylanpınar Devlet Hastanesi- Şanlıurfa

2006-2011 Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji AD- Bursa

Yabancı Dili : İngilizce