

158005

**T. C.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı**

**ISPARTA BÖLGESİNDE
ENTEROKOK TÜRLERİNDE
GLİKOPEPTİD VE YÜKSEK DÜZEY AMİNOGLİKOZİD
DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI VE ANTİBİYOTİK
DUYARLILIK TESTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. M. Cem ŞİRİN

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Ali Kudret ADILOĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 0730-TU03 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2004

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde emeği geçen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, değerli hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Buket Cicioğlu Arıdoğan'a, sıkıntılı zamanlarımda beni hoŐgörüyle dinleyen, bana deneyimleriyle yol gösteren, destek olan Doç. Dr. Mustafa Demirci'ye, tez çalıŐmam sırasında bilgi ve yardımlarımı esirgemeyen tez danıŐmanım Yrd. Doç. Dr. Ali Kudret Adiloğlu'na, her türlü katkı ve desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Selçuk Kaya'ya sonsuz Őükran ve saygılarımı sunarım.

Asistanlığım boyunca laboratuvar çalıŐmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarımı gördüğüm asistan arkadaşlarıma, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma, bana rahat ve huzurlu bir çalışma ortamı sağlayan eŐim Burcu Şirin'e teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Kısaltmalar	iii
Tablo, Şekil ve Resim Listesi	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe	2
2.2. Morfoloji, Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri	3
2.3. İdentifikasyon	4
2.4. Tür düzeyinde identifikasyon (Tiplendirme)	6
2.5. Patogenez	9
2.6. Klinik İnfeksiyonlar	10
2.7. Antimikrobiyal Direnç	12
2.8. Tedavi	20
2.9. Antimikrobiyal duyarlılık testleri	23
2.10. Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. İzolasyon ve identifikasyon yöntemleri	31
3.2. Antibiyotik duyarlılık testleri	33
4. BULGULAR	39
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	58
ÖZET	59
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	63

KISALTMALAR

PYR	: L-pyrrolidonyl β naphthylamide
LAP	: L α -Lysin aminopeptidaz
CNA	: Colombia colistin-nalidixic acid agar
PEA	: Feniletil alkol agar
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
CHEF	: Contour-clamped homogenous electric field
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD-PCR	: Randomly amplified polymorphic DNA-Polimeraz chain reaction
ITS-PCR	: PCR amplification of intergenic rRNA spacer regions
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
SDS-PAGE	: Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PBP	: Penisilin bağlayan protein
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyonu
mcg/lt	: mikrogram/litre
3'-APH	: 3'-aminoglikozid fosfotransferaz
3''-AAD	: 3''-adenil transferaz
ORF	: Open Reading Frame
VRE	: Vankomisine dirençli enterokok
VDE	: Vankomisin depandan enterokok
BHIA	: Brain-Heart Infusion Agar
YDAD	: Yüksek düzey aminoglikozid direnci
MHA	: Mueller-Hinton agar
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
NNIS	: National Nosocomial Infections Surveillance
HICPAC	: Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
MRSA	: Metisiline dirençli S. aureus
MRSE	: Metisiline dirençli S. epidermidis
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
YDGD	:Yüksek düzey gentamisin direnci
YDSD	:Yüksek düzey streptomisin direnci

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Tablo 1.	Gram (+), katalaz (-) fakültatif anaerob bakterilerin fenotipik özellikleri	5
Şekil 1.	Enterokok türlerinin biyokimyasal sınıflandırılması	7
Tablo 2.	Enterokoklarda antibiyotik direnci	13
Tablo 3.	Enterokoklarda glikopeptid direnç fenotipleri	18
Şekil 2.	Vankomisin direncinden sorumlu Transpozon 1546 üzerindeki genler ve fonksiyonları	19
Resim 1.	API Rapid ID 32 Strep stripi	33
Tablo 4.	Antibiyotik diskleri ve inhibisyon zon çapları	34
Resim 2.	API ATB Enteroc 5 stripi	35
Resim 3.	Penisilin direncinin mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması	36
Tablo 5.	MİK yorumlama standartları	37
Resim 4.	Vankomisin, gentamisin, streptomisin direncinin E-test yöntemi ile araştırılması	38
Tablo 6.	Suşların türlere göre dağılımı	39
Tablo 7.	Suşların çeşitli klinik örneklerle göre dağılımı	39
Tablo 8.	Disk difüzyon yöntemine göre saptanmış antibiyotik duyarlılıkları	40
Tablo 9.	API ATB Enteroc 5 kitine göre antibiyotik duyarlılıkları	41
Tablo 10.	Referans broth mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları	42
Tablo 11.	Disk difüzyon ile API ATB Enteroc kitinin karşılaştırılması	43
Tablo 12.	Testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları	43
Tablo 13.	Agar tarama ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması	44
Tablo 14.	Suşların türlere göre antibiyotiklere direnç durumları	44
Tablo 15.	Çeşitli çalışmalarda enterokoklarda YDGD ve YDSD oranları	55

1.GİRİŞ

Enterokoklar, *Enterococcus* genusunda yer alan gram pozitif koklardır. İnsanlarda normalde ağız boşluğu, barsak, safra yolları, deri, vajina ve anterior üretral florada bulunan bakterilerdir. En sık olarak üriner sistem infeksiyonlarına, karın içi infeksiyonlara, bakteriyemilere, daha az oranda endokardit, menenjit, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarına neden olmaktadırlar (1-4). Yirmiye yakın enterokok türü olmasına rağmen *E. faecalis* ve *E. faecium* insanlarda en fazla infeksiyon nedeni olan türlerdir (5).

Enterokoklar uzun yıllar insanda infeksiyon oluşturma potansiyeli düşük olan, endojen kaynaklı fırsatçı patojen bakteriler olarak tanımlanmıştır. Ancak son yıllarda enterokokal infeksiyonların insidansında büyük bir artış dikkati çekmekte ve bu mikroorganizmaların, ekzojen kaynaklı infeksiyonlara ve nozokomiyal yayılımlara yol açarak, özellikle yatan hastalarda önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olduğu belirtilmektedir (3, 6-8). Enterokoklar, hastane infeksiyonu olan bakteriyemi etkenleri arasında 3. sırada, cerrahi yara ve üriner sistem infeksiyonları arasında ise 2. sırada yer almaktadırlar (9-12).

Enterokok türleri ile oluşan sistemik infeksiyonlarda bir beta-laktam veya vankomisin gibi hücre duvarına etkili antibiyotik ve aminoglikozid grubu bir antibiyotiğin (gentamisin veya streptomisin) kombine tedavisi kullanılır. Son yıllarda enterokokal infeksiyonların tedavisi, yüksek düzey aminoglikozid direnci, beta-laktamaz üretimi, beta-laktamaz ile ilişkisiz penisilin direnci ve glikopeptid direnci gibi nedenlere bağlı olarak büyük bir sorun haline gelmiştir (6, 11, 13, 14).

Bu çalışmada, Isparta bölgesine özgü epidemiyolojik veriler elde edilmesi ve Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde nozokomiyal infeksiyonların kontrolünün sağlanması açısından, çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarında glikopeptid ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, agar tarama, E-test, API ATB Enteroc 5 antibiyotik duyarlılık yöntemleriyle araştırılması, bu yöntemlerin karşılaştırılması ve antibiyotik direnç profilinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Enterococcus (entérocoque) adı ilk kez Thiercelin tarafından 1899 yılında Fransa'da yayınlanan bir yazıda kullanılmıştır. Bu isim bulunan yeni diplokokların intestinal orijinli olduklarını vurgulamak için önerilmiştir. Aynı yıl MacCallum ve Hasting, sonraları hemolitik bir enterokok olduğu anlaşılan endokardite neden olan bir mikroorganizmaya *Micrococcus zymogenes* adını vermişlerdir. *Streptococcus faecalis* ismi ise ilk kez 1906 yılında Andrewes ve Horder tarafından endokarditli bir hastadan izole edilen mikroorganizmalar için kullanılmıştır (10, 13, 15, 16). Sherman 1937'de streptokokları piyojenik, viridans, laktik ve enterokoklar olmak üzere dört gruba ayırmıştır. Sherman'ın sınıflandırması, 1933 yılında enterokokların grup D antiserumlarıyla reaksiyon verdiğini ortaya koyan Lancefield tarafından yapılan serolojik sınıflandırmaya uymaktadır. Bu sınıflamada enterokoklar pH 9.6'da, 10°C-45°C'de, %6,5'lük NaCl varlığında üreyebilme, 60°C'de 30 dk. canlı kalabilme ve eskülini hidrolize edebilmeleri ile diğer streptokoklardan ayrılmaktadırlar (10, 11, 15). *S. bovis*, Sherman tarafından viridans streptokok olarak sınıflandırıldığı halde, daha sonra D bağışık serumu ile aglütinasyon verdiği belirlenmiştir. 1957 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de, *S. faecium* ayrı bir tür olarak tanımlanmamış ise de, bu mikroorganizmaların resmi terminolojiye girmeleri 1960'lı yılların ortalarında olmuştur. Hareketli enterokoklar 1935'lerde fark edilmiş, bazı hareketli enterokokların sarı bir pigment oluşturdukları 1950'lerde gözlenmiş ve bu suşlar için 1968'de *Streptococcus faecium var. casseliflavus* adı önerilmiştir. 1955'de Gauda peynirinden izole edilen bir enterokok, kötü kokusundan dolayı *E. malodoratus* olarak adlandırılmıştır. Bazı enterokokların sadece Lancefield grup D bağışık serumuyla değil, aynı sıklıkta grup Q bağışık serumu ile de aglütinasyon verdiği saptanmıştır. Bu bakterilere de *Streptococcus avium* adı 1967'de önerilmiş, 1974 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de bu isim kabul edilmiştir (10).

1984 yılında Schleifer ve Klipper Balz, *S. faecalis* ve *S. faecium*'un genusun diğer üyelerinden farklı olduğu ve ayrı bir genus oluşturmaları gerektiğini genetik

olarak kanıtlamışlardır. 1984'ten beri *Enterococcus* genusu içine *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. colombae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. seriolicida*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* olmak üzere 17 tür ilave edilmiştir. Bu türlerin de *Enterococcus* genusundan oldukları DNA-DNA, DNA-rRNA hibridizasyonları ile ve 16S rRNA dizilimi ile kanıtlanmıştır (6, 9, 10, 13, 15).

2.2. Morfoloji, Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Enterokoklar tek tek, ikili veya kısa zincirler halinde bulunan, sporsuz, gram pozitif koklardır. Katı besiyerindeki kolonilerden hazırlanan preparatlarda çoğunlukla kokobasil şeklinde görülürken, sıvı besiyerinden hazırlanan preparatlarda daha oval şekilli ve zincirler halindedir (9, 10, 17).

Enterokoklar, streptokoklar gibi katalaz negatiflerdir. Fakat bazı türler katalaz testinde zayıf bir köpürme ile gözlenen psödokatalaz üretirler (9, 10).

Enterokokların fakültatif anaerob koşullarda optimum üreme ısıları 35°C'dir. Bununla birlikte enterokokların değişik çevresel faktörler altında çoğalma yetenekleri mevcut olup, pH 9.6'da ve 10°C-45°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilmekte ve 60°C sıcaklıkta 30 dk. canlı kalabilmektedirler. Bütün suşlar %6.5 NaCl'de ürer ve %40 safra tuzu varlığında eskülünü hidrolize eder. Aynı zamanda A grubu streptokoklarda da görülebilen fakat diğer streptokoklarda görülmeyen L-pyrrolidonyl β naphthylamide (PYR) hidrolizi, *E. cecorum*, *E. colombae* ve *E. saccharolyticus* hariç tüm enterokokların karakteristik bir özelliğidir. Bütün suşlar lösin aminopeptidaz (LAP) üretmektedir. Enterokok türlerinin çoğu homofermentatif olup, gaz üretmezler ve glikoz fermentasyonun son ürünü olarak laktik asit meydana gelir. Oksidaz negatiftirler. G + C içeriği %37-45'dir (1, 6, 9, 10, 12, 17-22).

Enterokokların çoğu hücre duvarı ile ilgili olan D grup antijeni diye adlandırılan gliserol teikoik asit antijeni oluştururlar. Bilinmeyen bir suşu tiplendirirken D grup antijeni bakılması oldukça yardımcı bir testtir, ancak çok dikkatli değerlendirilmelidir. İnsan infeksiyonlarından izole edilen Pediokokların çoğu ve Lökönostokların hemen hemen yarısı D grubu antijenine sahiptirler. Enterokok türlerinin ise ancak % 80'i kapiller presipitasyon veya latex aglütinasyon yöntemi ile Lancefield'in grup D antijenine karşı antiserumla reaksiyona girer.

Enterokok suşlarının bazıları grup Q bağışık serumu ile de aglütinasyon vermektedirler (1, 6, 9, 10).

Enterokoklar, %5 koyun kanı içeren triptik soy agar, %5 koyun kanlı brain-heart infüzyon agarda veya aynı oranda hayvan kanı içeren herhangi bir agarda kolayca üreyebilmektedirler. Ayrıca Colombia colistin-nalidixic acid agar (CNA) ve feniletıl alkol agar (PEA) gibi selektif besiyerleri de enterokokların izolasyonunu sağlamaktadır. Eğer klinik örnek gram(-) bakterileri içeriyorsa, safra eskülin azid, Pfizer selektif enterokok agar veya azid içeren diğer ticari besiyerleri (Enterococcosel agar, D-Coccosel) primer izolasyon besiyeri olarak seçilebilmektedir. Azid gram(-) bakterilerin üremesini inhibe etmekte ve enterokoklar siyah koloniler halinde görülmektedir. 6 mcg/ml vankomisin ilaveli Enterococcosel broth ve brain-heart infüzyon agar, fekal örneklerden vankomisine dirençli enterokokların hızlı ve selektif tanısı için kullanılabilen besiyerleridir (9, 15, 23).

Enterokoklar, 35°C-37°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra kanlı agarda 0,5-1 mm çapında, keskin sınırlı, gri-beyaz, buğulu bir görünümde, hafif kabark S tipi koloniler oluşturmaktadırlar. *E. faecalis*'in bazı suşları at, tavşan veya insan kanlı agarda beta hemolitik koloniler oluşturmalarına rağmen koyun kanlı agarda beta hemoliz yapmazlar. *E. durans* kullanılan kanın türüne bağılı olmaksızın beta hemolitik koloniler oluşturmaktadır. Diğer tüm türler genellikle alfa hemolitik veya nonhemolitikdir (1, 9, 18, 24-26).

2.3. İdentifikasyon

Gram(+), katalaz(-) fakültatif anaerob koklar *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Gemella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Globicatella*, *Helcococcus* olmak üzere onbir cins altında toplanmaktadır (1).

Gram boyama özellikleri, koloni morfolojisi, hemoliz özellikleri, 10-45°C'de üreme, %6.5'lik NaCl'de üreme, eskülin hidrolizi, lösin aminopeptidaz üretimi, PYR hidrolizi, glikozdan gaz üretmeme, vankomisin direnci, enterokokları, diğer katalaz(-), gram(+) koklardan ayırt etmede kullanılan özelliklerdir. Enterokokların ve

diğer katalaz(-), gram(+) kokların bu özellikleri Tablo 1’de gösterilmiştir (1, 9, 10, 13).

Tablo 1. Gram (+), katalaz (-) fakültatif anaerob bakterilerin fenotipik özellikleri

Cins	VA	Gaz	PYR	LAP	BE	NaCl	10°C	45°C	Har	Hem
Enterococcus	S (a)	-	+	+	+	+	+	+	d	α,β,γ
Streptococcus	S	-	- (b)	+	- (c)	- (d)	-	d	-	α,β,γ
Globicatella	S	-	+	-	-	+	-	-	-	α
Lactococcus	S	-	+	+	+	d	+	- (e)	-	α,γ
Vagococcus	S	-	+	+	+	+	+	-	+	α,γ
Leuconostoc	R	+	-	-	d	d	+	d	-	α,γ
Pediococcus	R	-	-	+	+	d	-	+	-	α
Tetragenococ	S	-	-	+	+	+	-	+	-	α
Aerococcus	S	-	+	-	d	+	-	+	-	α
Gemella	S	-	+	d	-	-	-	-	-	α,γ
Helcococcus	S	-	+	-	+	+	-	-	-	α

VA: Vankomisin duyarlılığı (30 µg disk), Gaz: karbonhidratlardan gaz oluşturma, LAP: Lösin aminopeptidaz, BE: eskülin hidrolizi, NaCl: %6.5 NaCl’lü ortamda üreme, 10°C ve 45°C: 10°C ve 45°C’de üreme, Har: hareketlilik, Hem: hemoliz özelliği.

- Bazı suşlar dirençlidir, ancak yine de disk etrafında küçük bir inhibisyon zonu oluşur.
- A grubu streptokoklar PYR pozitifdir, diğerleri negatiftir.
- Viridans streptokokların %5-10’unda eskülin hidrolizi pozitifdir.
- Bazı beta-hemolitik streptokoklar %6.5 NaCl’de ürer.
- Bazı laktokok suşları 45°C’de çok yavaş üreme gösterirler.

Lactococcus, *Aerococcus*, *Leuconostococcus*, *Vagococcus* ve *Pediococcus* insan infeksiyonlarından izole edilmeleri ve safra-eskülin reaksiyonu ile %6.5 NaCl’de üreme gösterebilmelerinden dolayı, enterokokların sadece bu özelliklerine bakılarak identifikasyonu hatalı olabilmektedir. *Tetragenococci* türlerinin fenotipik karakterleri de enterokoklara benzemesine rağmen, bu türler insandan izole edilmemişlerdir. *Leuconostococcus* ve *Pediococcus* cinsleri karakteristik olarak vankomisine dirençlidirler ve bu özellikleri enterokoklardan ayırt edilmelerinde yardımcıdır. PYR aktivitesi *Enterococcus spp.* identifikasyonunda daha fazla kabul gören bir testtir, fakat A grubu streptokok suşları, *Lactococcus*, *Gemella* ve *Aerococcus* gibi cinsler de pozitif sonuç verebilmekte ve *E. saccharolyticus*, *E. cecorum*, *E. colombia* gibi enterokoklar ise negatif kalabilmektedir (1, 9, 10, 13, 27).

Grup D antijeni ile serolojik reaksiyon bazı suşları tanımlamada kullanılabilmektedir. Enterokoklar D grup antiserum ile %80 pozitif reaksiyon vermektedir. Ancak D grup antijenin bulunmuş olması enterokoklar için spesifik

değildir ve diğer gram(+) bakterilerde (*S. bovis*, *S. equinis*, *S. suis*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* vb.) de yaygın olarak bulunmaktadır (1, 9, 10, 13).

Klinik laboratuvarların çoğunda gram boyama ve koloni morfolojisi, %6.5 NaCl'de üreme ve eskülin hidrolizi enterokok tanısının konulması için yeterli kriterler olarak değerlendirilmektedir. Fakat bazı enterokoklar bu reaksiyonları oluşturabilmek için 48 saate gereksinim gösterebilirler (10, 13).

2.4. Tür düzeyinde identifikasyon (Tiplendirme)

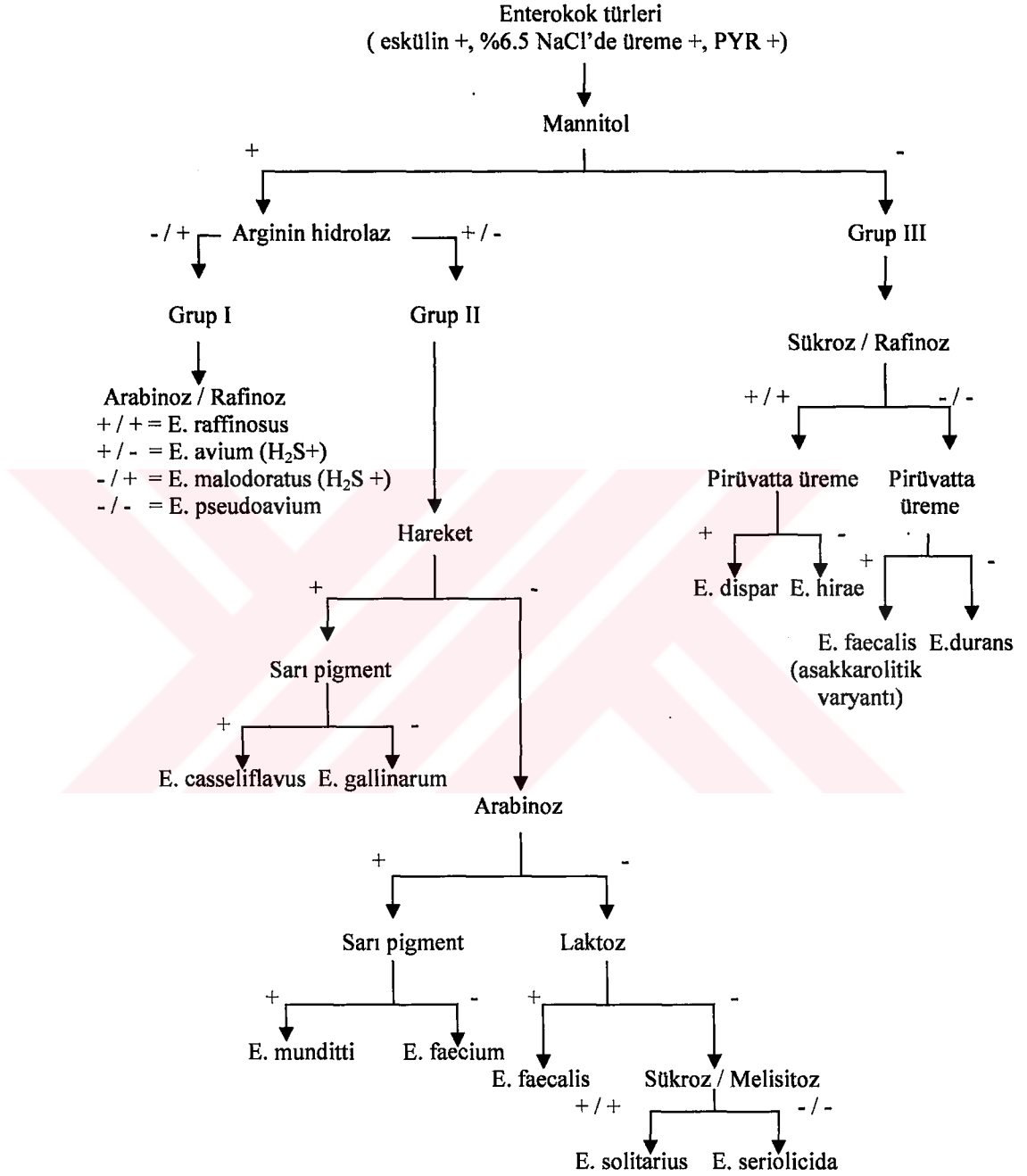
Enterokokların klasik tiplendirme yöntemleri içinde; bakteriosin tiplendirmesi, bakteriyofaj tiplendirmesi, biyokimyasal reaksiyon profilleri, antimikrobiyal direnç paternleri, serolojik yöntemler yer almaktadır. Bu metodlar bazen yararlı bilgiler vermesine rağmen, genellikle zaman alıcı, yapılması ve yorumlanması güç olan testlerdir. Suşlar arasındaki ayırımı yapmada yeterli değildirler ve epidemiyolojik çalışmalarda sınırlı değere sahiptirler (9).

Klasik yöntemlerden olan biyokimyasal testlerle, enterokoklar, mannitol, sorboz gibi şekerlerden asit oluşturmalarına ve arginini hidroliz etmelerine göre beş grupta sınıflandırılmaktadırlar (9, 28).

I. grup; *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus* ve *E. pseudoavium*'dan oluşur. Bu türler mannitol ve sorbozu fermente ederken, arginini hidroliz etmezler. Grup içindeki ayırımları ise arabinoz ve rafinozu fermente etmelerine ve pirüvatı kullanmalarına göre yapılır. *E. avium* arabinozdan asit oluşturup rafinozu kullanmazken, *E. malodoratus* ve *E. saccharolyticus* rafinozdan asit oluşturur ve arabinozu kullanmaz. *E. raffinosus* her ikisinden de asit oluşturur. *E. pseudoavium* bu karbonhidratları kullanmaz. *E. malodoratus* pirüvatı kullanırken, *E. saccharolyticus* pirüvatı kullanmaz.

II. grup; *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. solitarius* ve *E. seriolicida*'dan oluşur. Bu sekiz tür mannitolden asit oluşturur ve arginini hidrolize ederler. Sorbozdan asit oluşturmazlar ve *E. faecalis* grup içinde tellüriti tolere edebilen ve pirüvatı kullanan tek türdür. *E. faecium* ve *E. gallinarum* hareket testleriyle birbirlerinden ayırt edilir; *E. gallinarum* hareketli, *E. faecium* hareketsizdir. *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. flavescens* sarı pigment

oluşturur. *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* hareketli, *E. mundtii* hareketsizdir. *E. flavescens* ribozdan asit oluşturamaz, *E. casseliflavus* ise ribozu kullanır.



Şekil 1. Enterokok türlerinin biyokimyasal sınıflandırılması

III. grup; *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*'dan oluşur. Bu üç tür arginini hidrolize eder, fakat mannitol, sorbitol ve sorbozu fermente etmezler. Pirüvat, arabinoz, rafinoz ve sükroz testleri ile kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilebilmektedirler.

E. durans için testlerin tümü negatiftir. *E. hirae* için rafinoz ve sükröz testlerinden biri veya her ikisi pozitif, arabinoz ve pirüvat testi negatiftir. *E. dispar* suşlarında arabinoz testi hariç testlerin tümü pozitifdir.

IV. grup; *E. sulfureus* ve *E. cecorum*'dan oluşmuştur. Bu türler mannitol ve sorbozdan asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmezler.

V. grup; sadece *E. columbae*'dan oluşmuştur. Bu tür mannitol ve sorbitolden asit oluştururken, sorbozdan asit oluşturmaz ve arginini hidrolize etmez (9, 28).

Enterokok türlerinin hızlı tanısında API Rapid ID 32 Strep, API 20 Strep, RapIDSTR, Vitek Gram-Positive identifikasyon (GPI) kartı, Minitex Gram Positive kit, Microscan Gram Positive Breakpoint Combo panel gibi otomatize identifikasyon sistemleri kullanılmaktadır. Bu ticari kitlerin tümü enzimatik reaksiyonlar ve şekerlerin fermentasyonu esasına dayanmakta ve 4-24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda tür düzeyinde ayırım sağlamaktadırlar. Ancak bakterilerin zaman zaman atipik özellikler göstermesi tanıda otomatize sistemlerin yetersiz kalmasına ve yanlış tiplendirmelere yol açabilmektedir. Hazır ticari kitlerde en sık karşılaşılan sorun *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens*'in, *E. faecium* olarak değerlendirilmesidir. Bununla birlikte, Freney ve arkadaşları, Rapid ID 32 Strep (BioMérieux, France) yöntemini değerlendirdikleri bir çalışmada, yöntemin piyojenik hemolitik streptokokları ve enterokokları ekstra biyokimyasal testlere gereksinim duyulmaksızın doğru bir şekilde tanımladığını saptamışlardır (1, 5, 10, 27, 29).

Enterokokların tiplendirilmesi için geliştirilen ilk moleküler teknikler plasmid profillerinin analizi ve konvansiyonel elektroforez ile genomik DNA'nın restriksiyon enzim analizidir. Bununla birlikte bu metodların kullanımı sırasında yorumlamada problemlerle karşılaşılmaktadır. Enterokokları tiplendirmede kullanılan en yararlı metodlar pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz profillerinin analizidir. Contour-clamped homogenous electric field (CHEF) ve field inversion gel electrophoresis en yaygın kullanılan PFGE teknikleridir. Bu teknikler arasında CHEF'e daha çok başvurulmaktadır ve antimikrobiyal direnç paternlerinin değişkenliğini ortaya koymada ve tür ayırımında daha yararlı ve güvenilir olduğu gösterilmiştir. Ayrıca multilocus enzim elektroforezi, ribotiplendirme (ribozomal RNA gen restriksiyon

analizi) ve RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-Polimeraz chain reaction), ITS-PCR (PCR amplification of intergenic rRNA spacer regions), RFLP (restriction fragment length polymorphism) of PCR amplified 16S rDNA gibi PCR bazlı metodlar da enterokokların tiplendirilmesinde kullanılmıştır. Tür spesifik rRNA problemlerinin kullanıldığı ticari AccuProbe system (Gen-Probe, San Diego, USA) enterokokların tür düzeyinde ayırımını sağlamaktadır. Bunun yanında whole-cell protein profillerinin SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ile analizinin tipik ve atipik enterokok suşlarının tiplendirilmesinde nispeten basit, ucuz ve güvenilir bir metod olduğu gösterilmiştir (1, 9, 27, 30-32).

2.5. Patogenez

Enterokokların infeksiyon oluşturabilmesi için öncelikle konak dokuya tutunması ve kolonize olması gerekir. Bu doku genellikle mukozadır. Konak hücrelerine adhere olan bakteriler, konağın spesifik ve nonspesifik savunma mekanizmaları ile karşılaşır. Sonuçta enterokoklar direkt yoldan kendi toksinleriyle ve indirekt olarak inflamasyonu indükleyerek konakta patolojik değişiklikler oluşturmaktadırlar (25, 26). Bu olayların meydana gelmesinde enterokokların bazı virülans faktörleri de rol oynamaktadır. Bu faktörler:

1. Agregasyon maddesi: *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarında feromona cevap veren plasmidlerce kodlanan yüzeye bağlı bir proteindir. Bu madde donör (verici) bakterinin yüzeyini potansiyel alıcı bakteriye yapışabilen forma çevirir ve bu yolla konjugatif plasmid transferi gerçekleşir. Plasmidlerde virülans faktörleri ve birçok antibiyotiğe direnç sağlayan genler bulunmaktadır. Agregasyon maddesi, enterokokların intestinal ve renal epitel hücrelerine ve kardiyak vejetasyonlara yapışmasını da artırabilmektedir (1, 25, 26, 33).

2. Yüzey karbonhidratları: Enterokoklarda adhesin işlevi gördüğü, çeşitli insan hücrelerine yapışmada rolü olduğu bildirilmiştir (1, 25, 33).

3. Lipoteikoik asit: Tüm enterokokların yüzeylerinde bulunan ve grup D antijenini oluşturan bu madde açıl grupları aracılığıyla bakterinin konak doku ve hücrelerine bağlanmasında rol oynamaktadırlar. Ayrıca konakta TNF (tümör nekrozis faktör) ve interferon oluşumunu indüklemektedir (1, 25).

4. Sitolizin: *E. faecalis* ve *E. faecium*'da bulunmakta ve plasmide bağımlı üretilmektedir. Gram(+) bakterilere ve bazı ökaryotik hücrelere litik etki gösterirken gram(-) bakterilere etkisizdir. Koyun eritrositleri dışında insan, tavşan, at ve sığır eritrositlerine karşı hemolizin etkisi gösterir (1, 25, 26, 33).

5. Feromonlar: *E. faecalis*'ten salınan 7-8 aminoasit uzunluğunda küçük peptid molekülleridir. Suşlar arasında plasmid DNA'sının konjugatif aktarımını artırır. In vitro olarak nötrofiller için kemoatraktan etkisi vardır (1, 25, 33).

6. Proteaz (jelatinaz) : *E. faecalis*'ten izole edilen bir metalloprotein olup çinko endopeptidaz aktivitesi gösterir. Jelatinin, kollajenin, kazeinin, hemoglobinin ve diğer biyolojik olarak aktif küçük peptidlerin lizisine yol açmaktadır (25, 33).

7. Hyaluronidaz: *E. faecalis*'te bulunmakta ve mukopolisakkaridaz aktivitesiyle bakterinin bağ dokuda yayılmasını sağlamaktadır (25).

8. AS48: *E. faecalis* tarafından üretilen 7.4 kDa ağırlığında bir peptittir. Enterokoklar da dahil gram(+) ve gram(-) bakterilerin üremelerinin inhibe edilmesine ve lizisine yol açmaktadır. Hedef hücrelerin sitoplazmik membranlarında porlar meydana getirmektedir (1, 25).

2.6. Klinik İnfeksiyonlar

Enterokoklar, başta üriner sistem infeksiyonları olmak üzere intraabdominal ve pelvik infeksiyonlar, bakteriyemi, endokardit, yara ve yumuşak doku infeksiyonları, nadiren menenjit etkeni olabilmektedirler. Enterokokal infeksiyonlarda %80-90 oranında *E. faecalis*, %5-10 oranında *E. faecium* etken olarak bulunmaktadır. Diğer enterokok türleri (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium* ve *E. raffinosus*) klinik örneklerden nadiren izole edilmektedir (<%5). Relatif olarak düşük virülanslı olarak bilinmelerine rağmen birçok ciddi infeksiyonlara neden olabilmektedirler. Enterokoklar toplumda kazanılan infeksiyonların yanında hastane ortamının uygunsuz koşullarına dayanıklı olmaları ve birçok antibakteriyel maddeye dirençli olabilmeleri nedeniyle hastane infeksiyonlarına da sık olarak yol açabilmektedirler (1, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 24, 34).

Üriner sistem infeksiyonları: İnsanlarda en sık görülen enterokokal infeksiyonlardır. Çoğunlukla nozokomiyal olup, üriner sisteminde yapısal anomalileri olan veya katater uygulanan hastalarda görülmektedir. Enterokoklar

üriner sistem infeksiyonlarının %10'nundan, hastane kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarının ise %16'sından sorumludurlar (1, 6, 9, 10, 13, 14, 24).

İntraabdominal ve pelvik infeksiyonlar: İkinci sıklıkta karşılaşılan enterokokal infeksiyonlardır. Artmış antibiyotik kullanımı ve direnç gelişimi nedeniyle enterokoklar yara infeksiyonlarından artan bir sıklıkta izole edilebilmektedir. Bu infeksiyonlar genellikle polimikrobiyaldir ve enterokokların patogenezdaki rolleri tartışmalıdır. Enterokoklar intraabdominal abselerin %10-25'inden izole edilmektedir. Enterokoklar, nefrotik sendrom veya sirozlu hastalarda spontan peritonit yapabilmekte ve kronik peritoneal diyalize girenlerde peritonit etkeni olabilmektedirler. Ayrıca salpenjite, endometrite ve sezaryan sonrası abse oluşumuna yol açabilmektedirler. Safradan izole edilen mikroorganizmalar arasında *E. coli*'den sonra ikinci sırada gelmektedirler (1, 9, 10, 13, 24).

Bakteriyemi: Üçüncü sıklıkta görülen enterokokal infeksiyondur. Enterokoklar tüm nozokomiyal bakteriyemi nedenleri arasında üçüncü sırayı almaktadır. Daha çok altta yatan ciddi problemleri olan yaşlı hastalarda ve hastanede uzun süre yatan ve antibiyotik kullanan immün sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. Özellikle hastanelerde uygulanan invaziv girişimler, maligniteler, renal hastalıklar, diabetes mellitus gibi altta yatan primer hastalıklar, antibiyotik, immünosupresif ve H₂ blokerlerinin kullanımı enterokokal bakteriyemi insidansının artışına neden olmaktadır. Hemotolojik malignitesi bulunan hastaların nozokomiyal bakteriyemi açısından büyük bir risk altında olduğu belirtilmektedir. *E. faecalis* polimikrobiyal bakteriyemilerden en sık izole edilen gram(+) mikroorganizmadır. Enterokokal bakteriyemi kaynağı olarak en sık neden üriner sistem infeksiyonlarıdır ve enterokokal bakteriyemilerin %19-24'ünden sorumludur. Diğer önemli kaynaklar intraabdominal, biliyer, pelvik ve yara infeksiyonlarıdır. Enterokokal bakteriyemiye bağlı mortalite oranı genellikle yüksektir. Vankomisine dirençli enterokok ile oluşan bakteriyemilerde mortalitenin %60-70'e kadar çıkabildiği bilinmektedir. Bu olguların yaklaşık yarısında ölüm direkt olarak infeksiyona bağlıdır (8, 9, 10, 11, 24).

Endokardit: İnfektif endokarditli vakaların yaklaşık %5-15'inde etken enterokoklardır. Çoğu *E. faecalis* tarafından meydana getirilmektedir. Fakat *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* ve *E. raffinosus* da endokardit düşünülen vakalardan izole edilmektedir. Çoğu vakada altta yatan

valvüler kalp hastalığı veya prostatik kapak mevcuttur, fakat enterokoklar anatomik olarak normal kapakları da infekte edebilme yeteneğine sahiptirler. Enterokok endokarditi çocukluk yaş grubunda daha nadir olup yaşlılarda ve erkeklerde daha sık görülmektedir. Genitoüriner ve biliyer sistem infeksiyonları endokardit için risk faktörleri olup, yapılan bir çalışmada erkeklerin %50'sinde genitoüriner müdahale veya infeksiyon, kadınların ise %38'inde abortus ve genitoüriner müdahaleden sonra gelişen endokardit saptanmıştır. Enterokoklar genellikle mitral ve aortik kapakları daha sık tutma eğilimindedirler ve ilaç bağımlılarında da durum aynıdır. Vakaların çoğunda subakut bir başlangıç vardır (1, 6, 9, 10, 13, 24).

Enterokoklar nadiren saf kültür halinde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilmektedir. Genellikle cerrahi yara infeksiyonu, dekübit ülserleri, diyabetik ayak ülserleri ve yanıklardan diğer fakültatif ve anaerob bakterilerle birlikte izole edilmektedirler (1, 24).

Enterokoklar yetişkinlerde nadiren menenjitte yol açmaktadırlar. Malignensi, diabet veya böbrek yetmezliği gibi altta yatan ciddi hastalığı olanlarda, immünoşüpresif ajanlarla tedavi alanlarda, merkezi sinir sistemi travması veya cerrahisi geçirenlerde menenjit görülebilmektedir (1, 6, 10, 13, 35).

Ender olarak görülen solunum yolu infeksiyonları, genellikle çok ciddi hastalığı olan yaşlı ve debil hastalarda pnömoni şeklindedir (1, 24).

Enterokokların neden olduğu neonatal sepsis, akut başlangıçlı, bakteriyemi ve/veya menenjitin eşlik ettiği ateş ve solunum sıkıntısı ile karakterize bir hastalıktır. Daha çok nazogastrik sondası olan ve/veya intravasküler girişim yapılan ve altta yatan ciddi hastalığa olan prematür veya düşük doğum ağırlıklı bebeklerde ortaya çıkmaktadır (1, 10, 13).

2.7. Antimikrobiyal Direnç

Enterokoklar son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak giderek daha sık karşılaşılan ve aynı zamanda antimikrobiyal maddelere direnç oranlarında önemli artışlar kaydedilen bakterilerdir. Enterokok türlerinin birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmaları, plazmid ve transpozon aracılığıyla kazanılmış direncin diğer suşlara da aktarılması, vankomisin de dahil olmak üzere antibiyotiklere çoklu direnç gösteren suşların hızla yayılmasına yol açmıştır (10, 36, 37).

Enterokoklarda doğal (intrinsek=herediter=kromozomal) direnç ve kazanılmış (ekstresek) direnç olmak üzere iki farklı tipte antibiyotik direnci görülmektedir. İntrinsek direnç kromozomal olarak kodlanır ve hemen hemen türlerin hepsinde görülür. Kazanılmış direnç ise yeni bir DNA'nın edinilmesiyle veya var olan DNA'daki mutasyon ile ortaya çıkmaktadır (10, 13).

Tablo 2. Enterokoklarda antibiyotik direnci

İntrinsek direnç
Beta-laktamlar
Aminoglikozidler (düşük düzeyde)
Klindamisin
Trimetoprim-sülfometaksazol
Kazanılmış direnç
Beta-laktamlar (PBP' de değişiklik/ β -laktamaz üretimi)
Aminoglikozidler (yüksek düzeyde)
Glikopeptidler (vankomisin, teikoplanin)
Eritromisin
Klindamisin (yüksek düzeyde)
Tetrasiklin
Florokinolonlar
Nitrofurantoin
Rifampin
Kloramfenikol

2.7.1. İntrinsek direnç

Enterokoklar diğer gram(+) infeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanların çoğuna nisbi veya mutlak dirençlidirler (10, 24).

Enterokoklar penisilinlere, sefalosporinlere, monobaktamlara, in vivo trimetoprim-sülfometoksazola, düşük düzeyde aminoglikozidlere ve klindamisine intrinsek olarak dirençlidirler (1, 10, 13).

Beta-laktamlara nisbi direnç, enterokokların karakteristik bir özelliğidir. Bu tip direnç enterokok PBP₅'lerinin (penisilin bağlayan protein), beta-laktamlara düşük afiniteye sahip olmalarından meydana gelmektedir. Bu nedenle enterokoklar beta laktamlara tolerandırlar. Solomon adalarından izole edilen ve daha önce antibiyotiklerle karşılaşmamış enterokok suşlarında bile bu özellik görülmüştür.

E. faecalis için in vitro testlerde penisilinin ortalama MİK değeri 2-8 mcg/ml arasındadır ve bu değer birçok streptokok için olan ortalama MİK değerinden 10-100 kat daha yüksektir. *E. faecium* suşları, *E. faecalis* suşlarına oranla penisiline daha dirençli bulunmaktadır ve penisilinin ortalama MİK değerleri 16-32 mcg/ml arasındadır. Sefalosporinlerin hiçbiri enterokok üremesini inhibe edemediği gibi, sefalosporin kullanılması dirençli enterokok infeksiyonuna neden olan risk faktörlerindedir. Penisilinde olduğu gibi, imipenem de *E. faecalis*'e *E. faecium*'dan daha etkindir (10, 11, 38, 39, 40).

Enterokokların diğer özelliklerinden biri de klindamisin ve linkomisine dirençli olmalarıdır. Çoğu suş için bu antibiyotiklerin MİK değeri 12.5-100 mcg/ml'dir fakat bazı suşlarda yüksek düzeyde kazanılmış direnç (MİK>1000 mcg/ml) görülmüştür (10).

Enterokoklar intrinsik olarak aminoglikozidlere de düşük düzeyde dirençlidirler. Direncin nedeni, bakteri hücre duvarının bu antibiyotiklere karşı geçirgenliğinin düşük olmasıdır. Beta-laktam veya hücre duvarı sentezini engelleyen bir antibiyotik ile kombine edildiğinde bu direnç aşılabılırse de, yüksek düzeyde aminoglikozid direncinde bu sinerjistik etki kaybolmuştur. *E. faecium* suşları, türe spesifik olarak gentamisin dışında kanamisin, tobramisin, sisomisin ve netilmisini modifiye eden 6' asetiltransferaz enzimi oluştururlar. Kromozomal olan bu enzim düşük düzeyde dirence neden olmakta ve diğer enterokok suşlarına transfer edilememektedir (10, 13, 39).

Enterokoklar in vitro duyarlılık deneylerinde trimetoprim-sülfometoksazole duyarlı bulunursalar da in vivo olarak folik asidi, dihidrofolatı ve tetrahidrofolatı dış kaynaklardan alabildiklerinden trimetoprim-sülfometaksazola dirençlidirler (1, 10, 13).

2.7.2. Ekstresek direnç

Antibiyotiklere karşı kazanılmış direnç mevcut DNA'da meydana gelen bir mutasyon veya yeni DNA kazanılması ile oluşmaktadır. Dirence yol açan DNA genel olarak transdüksiyon veya konjugasyon ile kazanılır. Enterokoklarda transformasyon ile gen kazanımı gösterilememiştir (10).

Kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin dirençleri, klindamisine yüksek düzeyde direnç, aminoglikozidlere ve vankomisine yüksek düzey direnç sıklıkla plasmid ve/veya transpozonlarca aktarılmaktadır. Rifampin ve florokinolonlara direnç ise mutasyon ile sağlanmaktadır. Kloramfenikol direnci enterokokların %20-42'sinde görülür ve direnç asetiltransferaz enzimi tarafından sağlanır. Tetrasiklin direnci %60-80 arasında görülür ve tetL, tetM, tetN ve tetO genleri tarafından düzenlenir. Eritromisin direnci ise enterokoklar arasında yaygın olup Tn 917 transpozon üzerinde kodlanmaktadır (10, 13, 38).

2.7.2.1. Beta-laktam antibiyotiklere kazanılmış direnç

Bu direnç, beta-laktamaz yapımı ve düşük afiniteli PBP yapımı olmak üzere iki temel mekanizma ile meydana gelmektedir (41, 42).

Enterokoklarda ilk kez 1983 yılında tespit edilen ve aminoglikozid-beta laktam sinerjist etkisinin kaybolmasına neden olan penisilin direnç mekanizması beta-laktamaz sentezidir. Penisilinaz aktivitesi, yüksek gentamisin direncine de neden olan bir plasmid üzerinde bulunmuştur. Bu enzim penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri inaktive edebilmektedir. Nafsilin, sefalosporinler ve imipenem bu enzime dayanıklıdır. Enterokokların beta-laktamaz geni klonlanmış ve DNA dizisi tespit edilmiştir. DNA dizisi stafilokoklardan elde edilen beta-laktamaz geninin DNA dizisi ile %90'dan fazla benzerlik göstermektedir. Bu nedenle enterokoklardaki beta-laktamaz geninin, stafilokoklardaki beta-laktamaz geninden transfer edildiği tahmin edilmektedir. Enterokokal beta-laktamazlar yapısal olarak sentezlenirler ve hücreye bağlı olarak bulunurlar. Fakat *S. aureus*'un ürettiği beta-laktamazlar tipik olarak indüklenebilir olup, hücre dışındaki ortama salınmaktadır. Enterokoklarda beta-laktamaz üretimi düşük düzeyde ve inokulumu bağlı olduğundan rutin disk duyarlılık testleriyle tespit edilememektedir. Beta-laktamaz tespiti için nitrosefin testi gibi enzimatik metodlar gereklidir (10, 11, 13, 39, 43, 44).

Yüksek düzey penisilin direnci sadece beta-laktamaz üretimi ile ilgili olmayıp beta-laktamlara ilgisi az olan PBP üretiminde artış ve/veya PBP'lerin beta-laktamlara ilgisinde bir azalma sonucunda da ortaya çıkabilmektedir. Son yıllarda bu şekilde beta-laktamaz salgılamayan yüksek düzeyde penisiline dirençli *E. faecium* suşları giderek artan oranlarda izole edilmektedir (10, 13, 38, 39).

2.7.2.2. Aminoglikozidlere yüksek düzeyde kazanılan direnç

İntrensek olarak düşük düzeyde aminoglikozid direnci gösteren enterokoklar, aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde de direnç kazanabilmektedirler. Bu tür direnç gösteren bakterilerde, duvar sentezini inhibe eden bir antibiyotik ile aminoglikozid antibiyotik kombinasyonundan elde edilen sinerjistik etki kaybolmuştur. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci iki farklı mekanizma ile meydana gelmektedir:

1. Ribozomal direnç; ribozomlarda aminoglikozid bağlanma yerinin değişmesi ile oluşmaktadır. Yalnız streptomisine karşı gelişen ve transfer edilemeyen bu tür direnç nadirdir.

2. Aminoglikozid modifiye eden enzimlerin sentezi ile oluşan direnç; duyarlı suşlara transfer edilemediğinden hızla yayılan bu tür dirençte adeniltransferaz, fosfotransferaz ve asetiltransferaz enzimleri rol oynamaktadır. Bu enzimler antibiyotik üzerinde adenil, fosfor, ve asetil kökleri transfer ederek ilacın molekül yapısını değiştirmektedirler. Yüksek düzeyde gentamisin direnci gösteren enterokoklar genellikle bu grubun tüm üyelerine dirençlidir.

1970'li yılların başlarında, sırasıyla *E. faecalis* ve *E. faecium*'da kanamisin ve amikasinin inaktive eden plasmid aracılı 3'-aminoglikozid fosfotransferaz (3'-APH) ve *E. faecalis*'de plasmid aracılı streptomisini inaktive eden 3''-adenil transferaz (3''-AAD) enzimleri bulunmuştur. Streptomisin ve kanamisine karşı gelişen bu yüksek düzeyde direnç başlangıçta pek sorun olarak görülmemiştir. Ancak 1979 yılında ilk olarak *E. faecalis*'de gentamisin inaktive eden plasmid aracılı bifonksiyonel bir enzim olan 2''-aminoglikozid fosfotransferaz-6'-aminoglikozid asetiltransferaz (2''-APH-6'-AAC) tanımlanmıştır. Bu enzim gentamisinden başka kanamisin, amikasin, netilmisin, sisomisin ve tobramisinine karşı da yüksek düzeyde aminoglikozid direncine neden olmaktadır. Dolayısıyla gentamisin direnci streptomisin dışındaki diğer aminoglikozidler için de iyi bir yol göstericidir.

1983 yılında gentamisin ve streptomisin dahil tüm aminoglikozidlere karşı yüksek düzeyde direnç gösteren *E. faecalis* kökenleri soyutlanmıştır. Son olarak 1988 yılında *E. faecium*'da gentamisinine karşı plasmid aracılı bifonksiyonel enzim ile (2''-APH-6'-AAC) direnç gelişimi saptanmıştır (1, 10, 11, 13, 43, 45-49)

2.7.2.3. Glikopeptid direnci

Vankomisin ve diğer glikopeptidler, hücre duvarı yapımı için gerekli olan pentapeptidlerin son ucundaki ikili peptid D-alanil-D-alanin'e bağlanarak bakterinin hücre duvarı sentezinin son aşamasını inhibe etmektedir (11, 13, 38, 50, 51).

Glikopeptid direnci, enterokoklarda en çok endişe verici kazanılmış direnç olup ilk kez Fransa ve İngiltere'den 1988 yılında bildirilmiştir. Ardından Amerika'dan ve diğer ülkelerden bildirilmiş ve gittikçe artan sıklıkta yayınlar devam etmiştir (11, 52, 53).

Vankomisine direncin, bakterinin yeni bir D-ala-D-ala ligaz enzimi aracılığıyla D-ala-D-ala distal ucunun yapısını değiştirerek ilacı artık buraya bağlanamaması ile meydana geldiği sanılmaktadır. Başta *E. faecium* olmak üzere *E. faecalis*, *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus* suşlarında gösterilen bu direnç VanA, vanB, VanC, VanD, VanE olarak sınıflandırılmıştır (11, 13, 38, 50).

VanA tipi direnç: Dirençten 39 kDa ağırlığında, VanA adı verilen bir membran proteini sorumludur. Bu proteinin sentezini VanA geni sağlar. Bu gen plasmid üzerinde olduğundan diğer bakterilere kolaylıkla transfer edilebilmektedir. Genin ekspresyonu sonucunda D-ala-D-ala yerine D-ala-D-laktat ile sonlanan anormal peptidoglikan prekürsörleri sentezlenmekte ve vankomisin D-ala-D-lac'a daha düşük bir afinite ile bağlanmaktadır. Bakteri hem vankomisine hem de teikoplanine dirençlidir. Vankomisin direnci yüksek düzeyde (MİK \geq 64 mcg/ml) ve indüklenebilir bir dirençtir. Dirence neden olan membran proteini ancak vankomisin varlığında sentezlenir. Teikoplanin ise zayıf bir indükleyicidir (MİK \geq 16 mcg/ml). VanA tipi dirence en sık *E. faecium*'da, daha sonra *E. faecalis*'te ve nadiren *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. munditti* ve *E. raffinosus*'ta rastlanılmaktadır (1, 11, 38, 43, 50, 54).

VanB tipi direnç: Direnç VanB adı verilen genin sentezlettiği 39.5 kDa molekül ağırlıktaki VanB membran proteini tarafından oluşmaktadır. VanB geninin, VanB₁, VanB₂, VanB₃ olmak üzere üç farklı subtipi olduğu saptanmıştır. İndüklenebilir ve transfer edilebilir özelliktedir ve bakteriler vankomisine düşük veya yüksek düzeyde dirençli (MİK 32-64 mcg/ml), teikoplanine duyarlıdır. Bununla birlikte teikoplanine dirençli VanB geni içeren mutant VRE suşları da görülebilmektedir. VanB tipi direnç

en yaygın olarak *E. faecium* ve *E. faecalis*'te, seyrek olarak *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*'da saptanmıştır. Bu tip direnç *S. bovis* ve *S. gallolyticus*'ta da gösterilmiştir (1, 11, 38, 43, 50, 55).

VanC tipi direnç: Bu tip direnç *E. gallinarum* (VanC₁), *E. casseliflavus* (VanC₂), *E. flavescens* (VanC₃) gibi enterokok türlerinde görülmektedir. VanC direnç geni tarafından sentezletirilen VanC membran proteini ile oluşmaktadır. Gen ekspresyonu sonucunda D-ala-D-ser ile biten peptidoglikan prekürsörleri sentezlenir. Yapısal, indüklenemez ve transfer edilemez bir dirençtir. Tüm suşlar vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK 4-32 mcg/ml), teikoplanine duyarlıdır (1, 11, 38, 43, 50).

VanD tipi direnç: *E. faecium*'da gösterilmiştir. Suşlar vankomisine (MİK 64-256 mcg/ml) ve teikoplanine dirençli (4-32 mcg/ml) bulunmaktadır. Aminoasit sekansı VanA ve VanB ile %67 oranında ortaklık göstermektedir. Direnç geni kromozomda kodlanmakta ve transfer edilememektedir (11, 37, 50, 56).

VanE tipi direnç: Son zamanlarda bulunmuş olan bu tip direnç *E. faecalis* BM4405'te gösterilmiştir. Suşlar vankomisine düşük düzeyde dirençli (MİK 16 mcg/ml), teikoplanine duyarlıdır. Aminoasit sekansı VanC ile %55, VanA ile %45, VanB ile %43, VanD ile %44 oranında benzerlik göstermektedir (11, 50).

Tablo 3. Enterokoklarda glikopeptid direnç fenotipleri

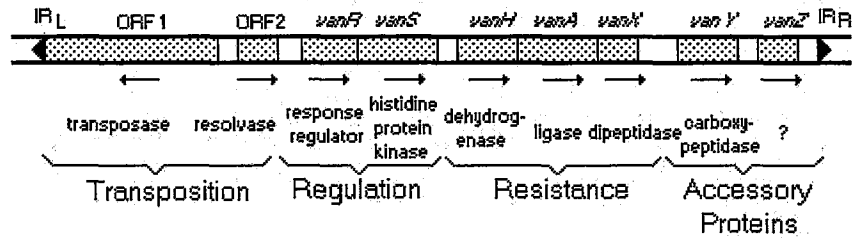
	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE
Vankomisin MİK	64 ->1000	4 ->1000	2-32	128	16
Teikoplanin MİK	16-512	<0.5	<0.5	4	0.5
Direnç tipi	Kazanılmış	Kazanılmış	İntrensek	Kazanılmış	Kazanılmış
En sık türler	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Transfer edilebilme	+	+	-	-	-
İndüklenebilme	+	+	-	-	+
Terminal peptid	D-ala-D-lac	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser	D-ala-D-lac	D-ala-D-ser

Enterokoklarda VanA ve VanB direncini sağlayan genler enterokok türleri arasında aktarılabilirdiği gibi A grubu ve viridans grup streptokoklara, laktobasillere,

Bacillus subtilis ve *Listeria monocytogenes*'e de aktarılabilmektedir. *E. faecalis* suşlarından glikopeptid direnci in vitro ve in vivo olarak *S. aureus*'a transfer edilebilmiştir (1, 10, 11, 37, 38, 43, 56).

VanA ve VanB genleri geniş aktarılabılır elementler üzerinde lokalize olmuşlardır. VanA genler grubu 10.8 kb'lık Tn1546 transpozonda lokalize iken, VanB 64 kb'lık transpozon üzerinde lokalize olmuştur. VanA tipi direnci sağlayan Tn1546 transpozonu 9 adet gen içerir; bunlardan 2 tanesi transpozisyon fonksiyonu ile ilgili proteinleri kodlarken (ORF 1 ve ORF 2), diğer 7 gen (VanH, VanX, VanY, VanZ, VanR, VanS, VanA) vankomisin direnci ile ilgilidir. VanR (response regulator) geni düzenleyici ve VanS (sense) geni ise algısal sistemin komponenti olan proteinleri kodlamaktadır. VanH, bir dehidrojenaz olup D-laktat sentezlemektedir. VanA ise bir ligazdır; depsipeptid oluşturmak üzere D-alanini D-laktat ile bağlamaktadır. VanX geni tarafından kodlanan VanX, DD-dipeptidaz yapısındadır ve D-Ala-D-Ala'yı hidrolize etmektedir. Bir karboksipeptidaz olan VanY, terminal uçtaki aminoasiti (D-alanin veya D-laktat) pentapeptid prekürsöründen ayırmaktadır. VanZ'nin fonksiyonu bilinmemektedir. VanY ve VanZ genleri vankomisin direncine yardımcı olan proteinleri kodlamaktadırlar, direnç ile ilgili direkt ilgileri bulunmamaktadır. Glikopeptid direnci için VanH, VanA ve VanX'in koordineli ekspresyonu gereklidir (11, 13, 38, 43, 50, 57).

Map of Tn 1546



Şekil 2. Vankomisin direncinden sorumlu Transpozon 1546 üzerindeki genler ve fonksiyonları

Enterokokların glikopeptidlere dirençli olmalarının yanında klinikte normal üremeleri için vankomisin varlığına gereksinim duyan vankomisine bağımlı suşlar da saptanmıştır. Vankomisin depandan enterokok (VDE), ilk kez 1992 yılında, cerrahi yoğun bakım ünitesinde yatan 46 yaşındaki bir kadın hastanın üriner sisteminden

izole edilmiştir. Klinik izolatlar arasındaki VDE insidansı ve prevalansı tam olarak bilinmemektedir. VDE’larda defektif D-ala-D-ala ligaz yapımı vardır ve normal peptidoglikan sentezi olmamaktadır. Ortamda glikopeptid bulunduğunda, alternatif yol olan D-ala-D-lak yapımı indüklenebilir ve bunun sonucunda peptidoglikan sentezi gerçekleşir ve hücre çoğalır. Ortamdan vankomisin kaldırıldığında, D-ala-D-lak yapımı uzun süre devam edemez, D-ala-D-ala yapımı bulunmadığı için, bakteri çoğalamaz. VDE’larda sadece vankomisin bağımlılığı yoktur, aynı zamanda vankomisin direnci de söz konusudur. Bu bakteriler VanA veya VanB’nin varyantlarıdır (11, 50, 57).

2.8. Tedavi

Enterokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisi, beta-laktamaz üretimi, beta-laktamaz ile ilişkisiz penisilin direnci, yüksek düzey aminoglikozid direnci ve vankomisin direnci gibi nedenlere bağlı olarak son yıllarda büyük bir sorun haline gelmiştir. Enterokokal infeksiyonların tedavisinde kullanılacak antibiyotik seçenekleri oldukça kısıtlıdır (6, 11, 58).

Diğer mikroorganizmalar için bakterisit olmalarına rağmen penisilin, ampisilin, vankomisin ve teikoplanin enterokoklar için bakteriyostatiktir. Bununla birlikte genelde çoğu enterokok infeksiyonunda penisilin veya ampisilin başlangıç tedavisi için iyi bir seçenektir. Özellikle bakterisidal etki gerektirmeyen üriner sistem infeksiyonları ve yumuşak doku infeksiyonlarında bu antibiyotikler tek başına kullanılabilir. Piperasilin ve mezlosilin gibi üreidopenisilinler de yeterli derecede etkilidir. Enterokoklara ampisilin penisilinden daha etkindir. Penisilin allerjisinde veya yüksek düzey penisilin direncinin söz konusu olduğu durumlarda vankomisin veya teikoplanin alternatif olarak seçilebilmektedir. Teikoplanin, duyarlı enterokoklar üzerinde vankomisinden 2-4 kat daha aktif olmasına karşın bakterisidal değildir. Beta-laktamaz üreten suşlarda vankomisin, imipenem, ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanik asit etkili ajanlardır. *E. faecium*, diğer türlere göre penisilinlere ve imipeneme daha dirençlidir (10, 11, 13, 24, 50, 57, 59-62).

Çoğu enterokok suşu nitrofurantoine duyarlıdır ve üriner sistem infeksiyonlarında bu ajanlar başarı ile kullanılmaktadır. Siprofloksasin ve ofloksasin gibi florokinolonlar in vitro olarak genellikle etkindirler ve bazı üriner sistem

infeksiyonlarında faydalı olabilmektedirler. Fakat genel olarak enterokokal infeksiyonlarda etkinlikleri yeterince gösterilmemiş olup, bazı merkezlerde bu antibiyotiklere direnç bildirilmiştir. Enterokoklara karşı bakteriyostatik etkili kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin ve rifampisin'in in vivo etkinlikleri zayıftır ve çoğu enterokok suşu bu ajanlara karşı dirençlidir. Fosfomisin, enterokoklara karşı etkin olmasına rağmen, direnç gelişimi tek başına kullanılmasını sınırlamaktadır (6, 10, 11, 13, 50, 57, 62).

Endokardit, bakteriyemi, menenjit gibi bakterisidal tedaviyi gerektiren ciddi enterokok infeksiyonlarında bir hücre duvarı sentezi inhibitörü ile bir aminoglikozid birlikte uygulanmalıdır. Bu kombinasyonda, hücre duvarı penisilinler veya vankomisin tarafından bozulmakta ve aminoglikozid (gentamisin veya streptomisin) bakteri hücrelerine daha kolay girerek bakterisid etkisini gösterebilmektedir. Standart endokardit tedavisinde önerilen kombinasyonlar penisilin / ampisilin - gentamisin / streptomisin veya vankomisin - gentamisin / streptomisin şeklindedir. Yüksek düzeyde aminoglikozid direnci gösteren suşlarda bu kombinasyon etkisizdir. Bakteri suşu sadece streptomisine dirençli ise diğer aminoglikozidler kullanılabilir. Ancak gentamisine dirençli ise bununla beraber kanamisin, amikasin, tobramisin, netilmisin ile yapılacak tedaviden bakterisid etki beklenilmemelidir. Tüm aminoglikozidlere yüksek düzeyde direnç gösteren suşlarla oluşan infeksiyonların tedavisinde optimal tedavi planının nasıl olacağı bilinmemektedir. Bununla birlikte hayvan modellerinde gentamisine yüksek düzeyde dirençli bir suşla oluşan enterokok endokarditinde devamlı ampisilin infüzyonunun intermitant tedaviden daha etkin olduğu saptanmıştır (6, 10, 11, 13, 50, 57, 62).

Vankomisine dirençli çoğu enterokok kökeni penisilin ve ampisiline duyarlı bulunabilmekte ve bu ilaçlar bu mikroorganizmalar ile oluşan infeksiyonların tedavisinde kullanılabilir. Hem vankomisin hem ampisiline dirençli bazı *E. faecium* suşlarının tedavisinde vankomisin-ampisilin kombinasyonu uygulanabilmektedir. Bu kombinasyonda vankomisin varlığında ampisilin MİK değerinde azalma meydana gelir ancak elde edilen etki bakterisidal değil bakteriyostatiktir. VanB geni taşıyan vankomisine dirençli, teikoplanine duyarlı suşlarda teikoplaninin in vitro etkili olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, teikoplanin in vivo tedavide başarısız bulunmuştur. İn vitro ve/veya hayvan modellerinde,

vankomisin-ampisilin-gentamisin, siprofloksasin-rifampisin-gentamisin, tetrasiklin-novobiyosin, siprofloksasin-novobiyosin, siprofloksasin-ampisilin kombinasyonları ile VRE infeksiyonlarının tedavisi için umut verici sonuçlar elde edilebilmiştir. Penisilin ve vankomisine dirençli *E. faecium* endokarditinin deneysel tedavisinde seftriakson-vankomisin-gentamisin kombinasyonunun penisilin-vankomisin-gentamisin veya penisilin-teikoplanin-gentamisin kombinasyonundan anlamlı ölçüde daha etkin olduğu gösterilmiştir. Tavşanlarda oluşturulan deneysel endokardit modellerinde ampisilin-imipenem tedavi rejiminin etkin olabileceği saptanmıştır (11, 13, 43, 50, 57, 62).

Çoğul dirençli enterokoklarla oluşan infeksiyonların tedavisi için insanlarda denenmiş ve kabul edilmiş çok fazla antimikrobik madde bulunmamaktadır. Çalışmaların çoğunluğu in vitro çalışmalar ve hayvan deneyleri şeklindedir. Yeni bir semisentetik streptogramin antibiyotik olan kinopristin/dalfopristin'in (RP 59500) vankomisine dirençli *E. faecium* ile meydana gelen prostetik kapak endokarditi, peritonit ve şant infeksiyonlarının tedavisinde başarı ile kullanıldığını bildiren yayınlar mevcuttur. Ancak *E. faecalis* suşlarında bu ilaca karşı yüksek oranda direnç gelişimi ile ilgili raporlar yayınlanmıştır (6, 11, 50, 57, 62-65). Daptomisin (LY 146032), in vitro ve hayvan deneylerinde olumlu sonuçlar vermiş, in vivo etkisi zayıf ve insanlarda toksik etkilere neden olduğu gözlenmiş bir asidik lipopeptittir (11, 57, 62). Ramoplanin, enterokoklara karşı bakterisidal etkili bir lipoglikodepsipeptittir. Gastrointestinal sistemden VRE'lerin ve VRE ile kolonizasyon riski oluşturmadan *C. difficile*'nin eradikasyonu için önerilmiştir (11, 57, 62, 66). Yeni bir semisentetik glikopeptid olan LY 333328'nin, in vitro çalışmalarda VRE'lara karşı bakterisidal etkili olduğu gözlenmiş ve VRE ile meydana gelen ciddi infeksiyonlarda klinik olarak yararlı, alternatif bir tedavi seçeneği olarak öne sürülmüştür (10, 50). Yeni florokinolonlardan klinafloksasin, sparfloksasin ve trovafloksasinin VRE'lara karşı etkili olduğu in vitro çalışmalarda ve tavşan endokardit modellerinde gösterilmiştir (13, 50, 57, 62). Tetrasiklin türevleri olan glisisiklinler, ketolidler (RU-64004 ve RU-66647), oksazolidinonlar (eperzolid ve linezolid) ve pristinamisin in vitro VRE'lere karşı etkili olan araştırma aşamasında olan diğer antimikrobiyal ajanlardır (10, 62).

2.9. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Bakteriyemi, endokardit gibi sistemik enterokok infeksiyonları, sıklıkla hücre duvarına etkili bir beta-laktam antibiyotik veya vankomisin gibi bir glikopeptid ve bir aminoglikozid (genellikle gentamisin veya streptomisin) kombinasyonu ile tedavi edilmektedir. Bu kombinasyonda antibiyotikler sinerjik etki göstermektedirler. Ancak hücre duvarı inhibitörüne direnç veya aminoglikozide karşı yüksek düzeyde direnç geliştiği zaman, bu sinerjizm ortadan kalkmakta ve kombinasyon tedavisi ile bakterisidal bir etki sağlanamamaktadır. Bundan dolayı enterokok infeksiyonlarının tedavisinden önce antibiyotik duyarlılık testleriyle hem hücre duvarına etkili antibiyotiklere hem de aminoglikozidlere karşı olan direncin varlığı araştırılmalıdır (44, 58, 67, 68).

2.9.1. Yüksek düzeyde aminoglikozid direncinin araştırılması

Rutin incelemelerde sadece gentamisine ve streptomisine karşı direncin araştırılması yeterlidir. Gentamisine dirençli olan suşlar, streptomisin dışındaki tüm aminoglikozidlere (amikasin, kanamisin, netilmisin, tobramisin, sisomisin) de dirençli olarak kabul edilmektedir. Streptomisine karşı gelişen yüksek düzeyde direnç farklı bir mekanizmayla kazanıldığından, streptomisin direnci gentamisin direncinden bağımsız olarak araştırılmaktadır (10, 44, 45). Yüksek düzeyde aminoglikozid direncini araştırmada kullanılan tarama testleri şunlardır:

Agar tarama yöntemi: 500 mcg/ml gentamisin ve 2000 mcg/ml streptomisin içeren brain-heart infüzyon (BHI) agara 0.5 Mc Farland yoğunluğundaki bakteri suspansiyonundan (10^6 CFU/ml) 10'ar mikrolitre ekim yapılır. Böylece agar yüzeyine bakteriler 10^4 CFU/ml olacak şekilde inoküle edilir. Ekilen plaklar 24 saat 37°C 'de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası besiyerinde birden fazla koloni görülmesi yüksek düzey aminoglikozid direncini (YDAD) göstermektedir. Streptomisinli besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonucu üreme yoksa 48 saate kadar inkübasyona devam edilir. BHI agar dışında Müeller-Hinton agar (MHA), %5 koyun kanlı MHA, dekstroz fosfat agar da besiyeri olarak kullanılabilir (10, 13, 44, 46, 67, 69).

Agar dilüsyon yöntemi: Bu yöntemde gentamisinin ve streptomisinin belli konsantrasyon aralığında (0.5 mcg/ml'den 2000 mcg/ml'ye kadar) iki kat seri

sulandırılmalarını içeren BHI agar plaklarına ekimler yapılmaktadır. Gentamisin için 500 ug/ml, streptomisin için 2000 ug/ml minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri yüksek düzeyde direnç olarak kabul edilmektedir (39, 70, 71).

Broth mikrodilüsyon yöntemi: Tek kuyucuklu broth mikrodilüsyon tarama yönteminde BHI sıvı besiyerine 500 mcg/ml gentamisin, 1000 mcg/ml streptomisin eklenmektedir. Test edilecek bakteri antibiyotikli besiyerine 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde inoküle edilmektedir. 24 saatlik inkübasyon sonrası üreme olması YDAD'ni göstermektedir. Antibiyotiklerin belirli konsantrasyon aralığında iki kat seri sulandırılmalarını içeren sıvı besiyerlerine ekimler yapılarak suşların MİK değerleri de saptanabilmektedir. Müeller-Hinton broth, sıvı mikrodilüsyon yöntemi için önerilmemektedir (13, 39, 44, 71-74).

Yüksek içerikli disk difüzyon yöntemi: Müeller-Hinton agar besiyeri, 120 mcg gentamisin ve 300 mcg streptomisin içeren diskler kullanılmaktadır. 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki bakteri suspansiyonlarından plaklara ekim yapılır ve diskler yerleştirilir. 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan 6 mm çapında inhibisyon zonu YDAD'ni, 10 mm veya daha büyük inhibisyon zonu ise duyarlılığı göstermektedir. 7-9 mm arasında zon çapı ölçülürse testin agar dilüsyon veya sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulanması gerekmektedir (10, 13, 39, 44, 68, 69, 71).

Ticari test sistemleri: Sceptor, MicroMedia, Pasco, Sensititre, Alamar, Uniscept, Autobac, Vitek, Microscan gibi otomatize ve nonotomatize yöntemler enterokoklarda YDAD, vankomisin direncini ve diğer antibiyotiklere karşı direnci araştırmada kullanılan piyasada mevcut ticari test sistemleridir. Bu ticari sistemlerde henüz bir standardizasyon sağlanamamıştır ve yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (68, 75-82).

Epsilometer test (E-test): Ticari bir ürün olan E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden), bir yüzeyinde belli konsantrasyonda antibiyotik içeren, diğer yüzeyinde ise bu konsantrasyonlara ait işaretlenmenin yer aldığı çok ince plastik stripler şeklindedir. Disk difüzyon yönteminde olduğu gibi, 0.5 Mc Farland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu MHA'a inoküle edilir. Striplerin antibiyotik içeren tarafı agar yüzeyine gelecek şekilde yerleştirilir ve 24 saat inkübe edilir. E-test etrafında elips şeklinde inhibitör zon oluşur, üremenin kesildiği konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edilir. Diğer klasik metodlara göre daha pahalı bir testtir. YDAD'ni,

vankomisin direncini araştırmada E-test ile güvenilir sonuçlar elde edilmiştir (39, 78, 83-87).

2.9.2. Vankomisin direncinin araştırılması

Agar dilüsyon, broth dilüsyon, disk difüzyon ve agar tarama metodları enterokoklardaki vankomisin direncini saptamada standart metodlar olup bunun yanında ticari duyarlılık testleri de mevcuttur. Disk difüzyon ve Vitek, Microscan gibi otomatize sistemlerde VanB ve VanC tipi düşük düzey vankomisin direncini saptamada problemlerle karşılaşılmaktadır (44, 76, 78).

Disk difüzyon yöntemi; Müeller-Hinton agarda 30 mcg vankomisin içeren disklerle yapılmaktadır. 14 mm veya altında inhibisyon zon çapı dirençli, 15-16 mm zon çapı orta duyarlı, 17 mm veya üstünde inhibisyon zon çapları duyarlı olarak kabul edilmektedir (71, 88).

Dilüsyon yöntemlerinde; 4 mcg/ml ve altında MİK değeri duyarlı, 8-16 mcg/ml MİK değeri orta duyarlı, 32 mcg/ml veya üstünde MİK değerleri ise dirençli olarak kabul edilmektedir (44, 71).

Agar tarama yönteminde; 6 mcg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyerleri kullanılmaktadır. Agar yüzeyine 0.5 Mc Farland bulanıklılığına göre hazırlanmış koloni suspansiyonundan 1-10 mikrolitre damlatılır. 37°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası agar yüzeyinde birden fazla koloninin varlığı vankomisin direncini göstermektedir. Testin duyarlılığı %96-99, spesifitesi %100 oranındadır (44, 76).

Vankomisin direncinin (özellikle VanB) saptanmasında tam otomatize yöntemlerin hepsi aynı ölçüde güvenilir değildir. Agar dilüsyon, disk difüzyon, agar screen plate, Vitek GPS-TA ve GPS-101, MicroScan overnight ve rapid panellerini karşılaştırıldığı bir çalışmada, VanA tipi direncin bütün yöntemler tarafından aynı güvenilirlikle saptandığı, ancak özellikle Vitek GPS-TA ve MicroScan rapid yöntemlerinin VanB tipi direncin saptanmasında başarısız olduğu bildirilmiştir. VanB tipi direncin saptanmasında Vitek GPS-TA ve MicroScan rapid yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %47 ve %53 olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada E-test ve agar tarama dışında diğer yöntemlerle VanC₁/VanC₂ tipi direncin saptanmasında da problemler olduğu gözlenmiştir. Enterokoklarda VanA, VanB ve VanC direnç tiplerini belirleyebilmek için tarama amacıyla kullanılacak en güvenilir ve kolay

yöntem agar tarama testidir. Yeni Vitek GPS-101 testi Vitek GPS-TA ile kıyaslandığında özgülüğünde azalma olmaksızın artmış duyarlılığa sahiptir (75).

Genotipik olarak vankomisin direncinin saptanması PCR yöntemi ile mümkün olup uygun primerlerin kullanılması ile plasmid, transpozon veya kromozom üzerinde bulunan direnç genlerinin (VanA, VanB, VanC₁, VanC₂, VanC₃) çoğaltılarak jel elektroforezi ile görünür hale gelmesi esasına dayanmaktadır. PCR özellikle düşük düzeyde vankomisin direnci (VanB veya VanC) taşıyan enterokok suşlarındaki direncin saptanması için yararlı bir yöntemdir. PCR, polimeraz enzimi kullanarak özgül nükleik asit segmentinin arka arkaya in vitro koşullarda sentezlenmesidir. Bir tüp içine hedef nükleik asit, primerler, Taq DNA polimeraz, deoksi nükleotid trifosfatlar (dNTPs), Mg⁺², tampon ve su konulduktan sonra sıra ile üç değişik ısıda denatürasyon (92-98°C), annealing (37-75°C) ve extensiyon (70-74°C) işlemleri ardarda tekrarlanarak hedef nükleik asitin çoğaltılması amaçlanmaktadır (11, 27, 89-91).

2.10. Epidemiyoloji, Korunma ve Kontrol

Enterokoklar, zor ortam koşullarında bile yaşamlarını sürdürebilme ve üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Toprakta, suda, gıdalarda, hayvanlarda, bitkilerde, kuşlarda ve böceklerde doğal olarak bulunmaktadırlar. İnsanda özellikle gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistemde yerleşiklerdir. *E. faecalis* insanların gastrointestinal sisteminden en sık izole edilen bakterilerden biridir (dışkıda 10⁵ –10⁷ CFU/gr) (9, 10, 13, 24).

Enterokoklar üriner sistem, karın içi, cerrahi yara, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, menenjit, neonatal sepsis, pnömoni gibi değişik infeksiyonlara neden olmaktadırlar. İnsanlarda enterokok infeksiyonlarından en sık *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri izole edilmektedir (9, 10, 13, 24).

Toplum kaynaklı infeksiyonların yanında, hastane ortamının uygunsuz koşullarına dayanıklı olmaları ve birçok antimikrobiyal ajana direnç geliştirebilmelerinden dolayı, enterokoklar, hastane infeksiyonlarına da yol açmaktadırlar. 1990'ların nozokomiyal patojeni olarak adlandırılan enterokoklar, en sık izole edilen hastane infeksiyon etkenleri arasında 2-3'üncü sırada yer almaktadırlar. Nozokomiyal infeksiyonların %12'sinden sorumlu olan bu

mikroorganizmalar, erişkin hastaların nozokomiyal yara ve idrar yolu infeksiyonlarından ikinci, bakteriyemilerden üçüncü sıklıkta izole edilmektedirler (7-12).

Enterokokların birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmalarının yanında, yüksek düzeyde aminoglikozidlere ve glikopeptidlere direnç kazanması büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Vankomisin direncinin laboratuvar koşullarında aralarında *S. aureus*'un da bulunduğu diğer bazı gram(+) mikroorganizmalara aktarılabilmesinin gösterilmesi sorunun bir başka boyutudur (11, 36, 37, 92, 93).

Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) çok hızlı bir yayılım göstermektedir. İlk olarak İngiltere ve Fransa'dan bildirilen VRE suşları günümüzde birçok ülkede infeksiyon ve/veya kolonizasyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. 1989'dan 1993'e kadar geçen süre içinde Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'ye bağlı National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) sistemine bildirilen nozokomiyal VRE infeksiyonlarının oranı %0.3'den %7.9'a çıkmıştır. Özellikle yoğun bakım ünitelerindeki VRE infeksiyonlarının oranında 34 kat artış (%0.4'den %13.6'ya) olmuştur. Ancak yoğun bakım dışında kalan hastalardan bildirilen nozokomiyal VRE infeksiyonlarında da bir artış eğilimi gözlenmektedir (11, 94-96).

Ülkemizde VRE infeksiyonlarının oranı düşük olmakla birlikte bu konudaki bildirimlerin başlamış olması yayılım açısından düşündürücüdür. Vankomisine dirençli ilk *E. faecium* suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden bildirilmiştir. Bunu 1999 yılı içinde İstanbul Tıp Fakültesi ve Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden bildirilen suşlar izlemiştir. Bu gelişmeler enterokoklarda glikopeptid direncinin yakın bir gelecekte ülkemizde de ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkabileceğinin habercisidir. Bu nedenle risk faktörlerinin, direnç saptama ve tarama yöntemlerinin, kontrol önlemlerinin iyi bilinmesi gerekmektedir (93, 94, 97-100).

Hastanede uzun süre kalma, vankomisin, metronidazol ve özellikle 3. kuşak sefalosporinler olmak üzere klindamisin, imipenem gibi geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, intraabdominal cerrahi girişimler, enteral beslenme, sukralfat kullanımı, böbrek yetmezliği, hastane içinde bir servisten diğerine transfer edilme, hematolojik malignansi/kemik iliği nakli kliniğinde veya yoğun bakım

ünitelerinde yatma, immüsupresyon, nötropeni, bakteriyemi, nazogastrik sonda ve mekanik ventilatör kullanımı, diyare VRE infeksiyonu ve/veya kolonizasyonu için risk faktörleridir (11, 37, 46, 50, 92, 94, 101-103).

VRE için en önemli rezervuar gastrointestinal sistemdir ve infeksiyon olgularının çoğunda ilk önce gastrointestinal kolonizasyon saptanır. Daha nadir olmakla birlikte sürveyans amacıyla alınan burun, boğaz, ağız veya cilt kültürlerinde de VRE saptanabilir ancak VRE kolonizasyonunu saptamak için en güvenilir yol gastrointestinal sistemin araştırılmasıdır. Bu amaçla perianal sürüntü kültürlerinin duyarlılık ve özgüllüğünün rektal kültürlerinki kadar yüksek olduğu gösterilmiştir. ABD’de bugün için en önemli VRE rezervuarı hospitalize hastalardaki gastrointestinal sistem kolonizasyonudur. Sağlıklı kişilerdeki VRE kolonizasyonu ise ciddi bir infeksiyon riski oluşturmamaktadır (11, 26, 57, 94, 101, 104-106).

Diğer birçok nozokomiyal infeksiyonda olduğu gibi VRE için de en önemli bulaş aracı sağlık personelinin elleridir. VRE sıcağa, soğuğa ve diğer ortam koşullarına dirençli olduğu için cansız yüzeyler üzerinde günler, hatta haftalar boyunca yaşayabilmektedir. El yıkamaya özen gösterilmemesi sonucunda sağlık personelinin ellerinde oluşan geçici VRE kolonizasyonu hastane içi yayılımında çok önemlidir. VRE ile kolonize ve/veya infekte hastaların odalarındaki yüzeyler ve tıbbi cihazlar sıklıkla bu mikroorganizma ile kontamine olur ve hastane içinde önemli bir VRE rezervuarı oluşturur. Bugüne kadar yapılan çok sayıda çalışmada hasta önlükleri, yatak ve yatak kenarları, steteskop, tansiyon aletleri, elektronik termometreler, EKG monitörleri, elektrodları ve kabloları, intravenöz sıvı pompaları, masalar gibi çok sayıda cihaz ve yüzeyden VRE izole edildiği bildirilmiştir. Özellikle diyaresi olan hastaların odasındaki kontaminasyonun daha yoğun olduğu bilinmektedir (11, 26, 50, 57, 94, 107).

Vankomisine dirençli enterokoklar, sadece hastane kaynaklı olmayabilir. Toplumdan edinilmiş VRE’in kaynakları konusunda değişik görüşler vardır. ABD’de kuru köpek mamasından VRE izolasyonu bildirilmiştir. Avrupa’da ise tavuk, domuz ve değişik kümes hayvanları ile kedilerde ve köpeklerde VRE izole edilmiştir. Bu durumun nedeni, hayvan yiyeceklerinde uzun zamandan beri barsak florasını düzenlemek ve stabilize etmek amacı ile *E. faecium* kullanılmasıdır. Bu bakterinin çeşitli antibiyotiklerin varlığında yaşayabilmesi, laktik asit ve bakteriyosin yaparak

zararlı bakterilere karşı potansiyel bir bariyer oluşturması da seçim nedenleri arasındadır. Önceleri *E. faecium*'un vankomisin direncinde önemli olabileceği düşünülmemiştir. VRE gelişiminde önemli bir diğer faktör avoparsin kullanımınıdır. Avoparsin bir glikopeptiddir ve Avrupa'da 1970'li yılların sonunda hayvanlarda büyüme faktörü olarak kullanılmaya başlanmış, bir süre sonra enterokoklar çapraz olarak vankomisine de direnç kazanmıştır. Avoparsin ABD'de lisans almamıştır ama Avrupa'da bazı ülkelerde ve Avustralya'da kullanılmaktadır. Bu nedenle toplum kaynaklı VRE izolasyonu Avrupa'da daha fazladır. Dolayısıyla ABD'ndeki epidemiyoloji daha farklıdır (6, 11, 13, 26, 50, 56, 57, 94)

Bütün bu bilgilere rağmen VRE epidemiyolojisi henüz netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte özellikle hastane ortamında VRE gelişimini önleyici bazı tedbirlerin alınması önerilmektedir. CDC'ye bağlı Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) tarafından 1995 yılında nozokomiyal VRE yayılımını kontrol altına alabilmek amacıyla bazı öneriler yayınlanmıştır. Bu öneriler dört ana başlık altında toplanmıştır:

1. Uygun vankomisin kullanımı: Vankomisin kullanımının VRE kolonizasyonu ve infeksiyonu için bir risk faktörü olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Ayrıca uygunsuz vankomisin kullanımının *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de vankomisine direnç gelişimine ve yayılımına zemin hazırlayacağı düşünülmektedir. Beta-laktam antibiyotiklere dirençli gram(+) bakterilerin neden olduğu ciddi infeksiyonlar, beta-laktam antibiyotiklere karşı ciddi allerjisi olan kişilerde gram(+) bakterilerle gelişen infeksiyonlar, metronidazole yanıt vermeyen veya çok ağır seyreden antibiyotiğe bağlı ishal olguları, American Heart Association önerilerine uygun olarak infektif endokardit profilaksisi, MRSA veya MRSE infeksiyonlarının oranının yüksek olduğu merkezlerde protez cihaz implantasyonu içeren majör cerrahi girişimler öncesi profilaksi dışındaki durumlarda vankomisin kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir.

2. Eğitim programı: Tüm hastane personeline VRE yayılımının önlenmesi amacıyla VRE'nin önemi, epidemiyolojisi ve kontrol yöntemleri hakkında sürekli bilgi ve eğitim verilmelidir.

3. Mikrobiyoloji laboratuvarının rolü: VRE'nin nozokomiyal yayılımının önlenmesi için VRE ile kolonize veya infekte olan hastaların vakit kaybetmeden

tespit edilmesi gerekmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından bakteri identifikasyon ve duyarlılık paterni sonuçlarının hızlı ve doğru bir şekilde verilmesi, kontrol önlemlerinin erken dönemde uygulanabilmesini ve yayılımın sınırlanmasını sağlar.

4. Kontrol önlemlerinin uygulanması: VRE infeksiyonu için tedavi gören hastaların odalarının temizliği ve dezenfeksiyonu titizlikle gerçekleştirilmelidir. VRE ile infekte veya kolonize olan hastaların izolasyonu, direkt temasın önlenmesi, hastayla temas sırasında eldiven ve önlük giyilmesi, el yıkama gibi infeksiyon kontrol önlemlerine uyulması ve bu hastalara bakım veren personelin ayrılması VRE ile oluşan infeksiyonların kontrolünde önemlidir (11, 13, 50, 94, 107).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 21.04.2002-14.08.2003 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 enterokok suşu incelendi.

Bakteri suşları %20 gliserol içeren Brain-Heart Infusion Broth'ta, -70°C'te identifikasyon ve duyarlılık testleri yapılincaya kadar saklandı. Stoklanan izolatlar çalışma günlerinde çözülerek iki kez kanlı agarda subkültürleri yapıldı.

Çalışmada kalite kontrol suşları olarak *E. faecalis* ATCC 29212 ve 51299, *S. aureus* ATCC 25923 standart suşları kullanıldı.

3.1. İzolasyon ve identifikasyon yöntemleri

Laboratuvara gelen materyaller %5 koyun kanlı agara ekilip, 37°C'de 24 saat süreyle aerob ortamda inkübe edildi. Alfa, beta veya gama hemoliz yapan, makroskopik olarak küçük, gri, parlak, buğulu bir görünüme sahip olan kolonilerin enterokok cinsinden olduğu düşünülerek incelemeye alındı. Gram pozitif kok morfolojisinde, katalaz negatif, %6.5 NaCl'lü agarda üreyen, eskülini hidrolize eden, PYR testi pozitif, 10°C-45°C'de üreyebilen, streptokok grup latex aglütinasyon testinde D grubu antiserum ile pozitif reaksiyon veren 100 bakteri suşu enterokok olarak tanımlandı (1, 6, 9, 10, 12, 17-22). Bu suşların tür tayini, üretici firmanın önerileri doğrultusunda API Rapid ID 32 Strep (BioMerieux, Fransa) kiti kullanılarak yapıldı.

3.1.1. Katalaz testi

Koyun kanlı agar üzerinde üreyen koloniler temiz bir lam üzerinde serum fizyolojik içinde süspansiyon edildi. Üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldıktan sonra gaz kabarcıklarının görülmesi halinde test pozitif, görülmemesi durumunda test negatif kabul edildi.

3.1.2. %6.5 NaCl'li ortamda üreme

10 gr casein pepton, 10 gr etli pepton, 65 gr NaCl ve 15 gr agar 1 litre distile suda eritilip, pH'ı 7.3'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 45-50°C'ye soğutulup, 50 ml defibrinize koyun kanı ilave edildi. Karışım steril petri kutularına 3-4 mm kalınlığında döküldü.

Test edilecek bakteriden 1-2 koloni alınıp besiyerine inoküle edildi. 37°C'de 24-48 saat inkübasyon sonrası üreme olup olmadığı değerlendirildi. Üreme olması pozitif sonuç olarak kabul edildi.

3.1.3. Safra-eskülin hidroliz testi

D grubu streptokoklar ve enterokoklar, safranın varlığında üreyerek eskülini hidrolize ederler. Eskülinin hidrolizi sonucu oluşan eskületin, demir sitrat ayırıcı ile reaksiyona girerek, siyah renkte bir kompleks oluşturur.

8 gr pepton, 20 gr safra tuzu, 0.5 gr ferrik sitrat, 1 gr eskülin ve 15 gr agar 1 litre distile su içinde eritilip, pH'ı 7.1'e ayarlandı. 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra, steril cam tüplere yatık bir şekilde döküldü.

Enterokok olabileceği düşünülen kolonilerden hazırlanan besiyerlerine çizgi ekimi yapıldı ve 37°C'de 24-48 inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyerinde siyahlaşma görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edildi.

3.1.4. Pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR) testi

Saf bakteri kültüründen birkaç koloni test kartına (Oxoid, İngiltere) yayıldıktan sonra, bir damla tampon çözelti test alanına damlatıldı ve 5 dk oda sıcaklığına bırakıldı. Bir damla developing solüsyonu damlatıldıktan 20 sn sonra test alanında mor renk oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.1.5. 10°C ve 45°C'de üreme

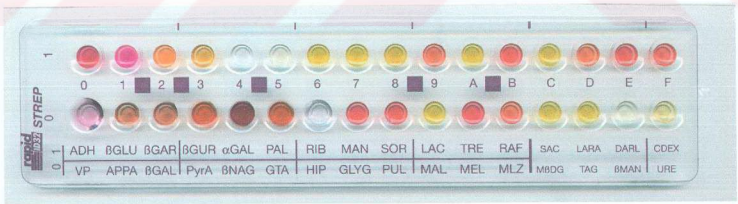
Şüpheli kolonilerden %5 koyun kanlı agara iki ayrı pasaj yapılarak, pasajlardan biri 10°C'ye, diğeri 45°C'ye ayarlanmış etüvlere konuldu ve 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Üreyen suşlar pozitif olarak değerlendirildi.

3.1.6. Streptokok grup lateks aglütinasyon testi

Streptokokların hücre duvarında bulunan gruba özgü antijenlerinin, lateks parçacıklarına bağlanmış A, B, C, D, F ve G gruplarına spesifik antikorlarla reaksiyona girerek gözle görülebilir bir aglütinasyon oluşması esasına dayanan bir testtir. Üretici firmanın (BioMerieux, Fransa) önerileri doğrultusunda hazırlanan bakteri süspansiyonları bir kart üzerinde grup spesifik antiserumlarla karıştırıldı. D grubu antiserumla aglütinasyon oluşması ve diğer grupların antiserumlarıyla aglütinasyon oluşmaması durumunda test pozitif olarak kabul edildi.

3.1.7. API ID 32 Strep kiti

API ID 32 Strep (BioMerieux, Fransa), dehidrate formda yedi oksidaz reaksiyonu, onyediyedi karbon substrat fermentasyonu, üç arilamidaz reaksiyonu, bir fosfataz ve dört klasik biyokimyasal testin yer aldığı 32 kuyucuktan oluşan bir strip içerir. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan 4 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonlarından, her kuyucuğa 55 mikrolitre dağıtıldı. Aerob koşullarda, 37°C'de 4 saatlik bir inkübasyondan sonra, stripler komputerize ATB Expression (BioMerieux, Fransa) cihazında okutulurak suşların tür tayini yapıldı.



Resim 1. API Rapid ID 32 Strep (BioMerieux, Fransa) stripi -*E. faecalis* suşu

3.2. Antibiyotik duyarlılık testleri

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, API ATB Enteroc 5 (BioMerieux, Fransa) kiti, broth mikrodilüsyon yöntemi, agar tarama yöntemi ve E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemleri ile 100 enterokok suşunun glikopeptid direnci, yüksek düzey

aminoglikozid direnci ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Suşların beta-laktamaz aktivitesi nitrosefin testi ile araştırılmıştır.

3.2.1. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi

Disk difüzyon yöntemi, NCCLS'in önerileri doğrultusunda, %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar ve Tablo 1'de belirtilen antibiyotik diskleri kullanılarak yapıldı.

17.5 gr casein pepton, 2 gr meat extract, 1.5 gr potato starch, 17 gr agar, 45-75 mg/L Ca^{+2} iyonu ve 20-35 mg/L Mg^{+2} iyonu 1 litre distile suda eritilip, pH'ı 7.3'e ayarlandı. 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra, 45-50°C'ye soğutulup, 50 ml defibrinize koyun kanı ilave edildi. Karışım steril petri kutularına 4 mm kalınlığında döküldü.

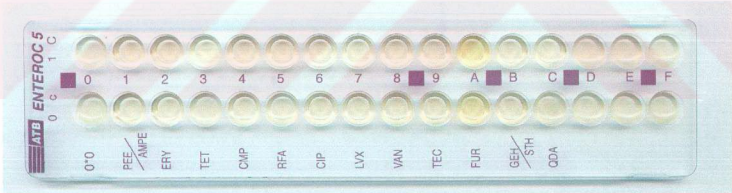
Suşların katı besiyerindeki 24 saatlik saf kültürlerinden bir-iki koloni buyyona süspansiyon edildi ve bulanıklık 0.5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonları steril pamuklu eküvyonlarla %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar yüzeyine önerilen şekilde yayıldıktan sonra antibiyotik diskleri aralarında en az 2 cm aralık olacak şekilde yerleştirildi. 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrası inhibisyon zon çapları ölçülerek duyarlılıklar belirlendi.

Tablo 4. Antibiyotik diskleri ve inhibisyon zon çapları

Antibiyotik	Disk içeriği	İnhibisyon zon çapları		
		Dirençli	Orta	Duyarlı
Penisilin	10 Ü	≤ 14	-	≥ 15
Ampisilin	10 µg	≤ 16	-	≥ 17
Vankomisin	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Teikoplanin	30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14
Gentamisin	120 µg	≤ 6	7-9	≥ 10
Streptomisin	300 µg	≤ 6	7-9	≥ 10
Eritromisin	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23
Tetrasiklin	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Siprofloksasin	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Norfloksasin	10 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Nitrofurantoin	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Rifampin	5 µg	≤ 16	17-19	≥ 20
Kloramfenikol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18

3.2.2. API ATB Enteroc 5 kiti

API ATB Enteroc 5 (BioMerieux, Fransa) yöntemiyle, suşların penisilin, ampisilin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, rifampin, siprofloksasin, levofloksasin, vankomisin, teikoplanin, nitrofurantoin, gentamisin, streptomisin ve kinopristin/dalfopristine duyarlılığı üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırıldı. Duyarlılık testi, yarı katı bir ortamda, agar dilüsyon veya mikrodilüsyon yöntemlerine benzer koşullar altında, herbiri farklı konsantrasyonda antibiyotik içeren 32 kuyucuktan oluşan bir strip ile yapılmaktadır. Penisilin (8 mg/L), ampisilin (8 mg/L), gentamisin (500 mg/L) ve streptomisin (1000 mg/L) tek konsantrasyonunu, eritromisin (0.5-4 mg/L), tetrasiklin (4-8 mg/L), kloramfenikol (8-16 mg/L), rifampin (1-2 mg/L), siprofloksasin (1-2 mg/L), levofloksasin (2-4 mg/L), vankomisin (4-16 mg/L), teikoplanin (8-16 mg/L), nitrofurantoin (32-64 mg/L) ve kinopristin/dalfopristinin (1-2 mg/L) iki farklı konsantrasyonunu içeren hazır kuyucuklara, yöntemde tarif edildiği şekilde hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan 135 mikrolitre konuldu. Sonuçlar 37°C'de, aerobik koşullarda, 18-24 saatlik inkübasyon sonrası bulanıklığın olup olmamasına göre değerlendirildi.



Resim 2. API ATB Enteroc 5 (BioMerieux, Fransa) stripi

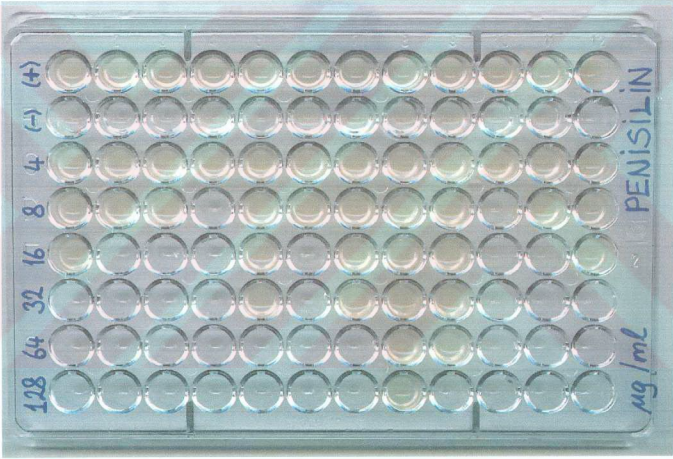
3.2.3. Broth mikrodilüsyon yöntemi

NCCLS'in önerileri doğrultusunda, mikrodilüsyon yöntemiyle, suşların penisilin (128-4 mcg/ml), ampisilin (128-4 mcg/ml), vankomisin (64-1 mcg/ml), eritromisin (32-0.25 mcg/ml), tetrasiklin (32-1 mcg/ml), siprofloksasin (32-0.25 mcg/ml), nitrofurantoin (512-8 mcg/ml) ve kloramfenikole (64-4 mcg/ml) karşı

duyarlılığını saptamak için MH broth, gentamisin (2000-125 mcg/ml) ve streptomisin (4000-250 mcg/ml) için BHI broth kullanıldı.

MH broth hazırlamak için, 17.5 gr casein pepton, 2 gr meat extract, 1.5 gr potato starch, 17 gr agar, 45-75 mg/L Ca^{+2} iyonu ve 20-35 mg/L Mg^{+2} iyonu 1 litre distile suda eritilip, pH'ı 7.3'e ayarlandı. 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra, karışım steril cam tüplere dağıtıldı.

BHI broth hazırlamak için, 17.5 gr brain-heart dehidrate ekstrektı, 10 gr meat pepton, 5 gr NaCl, 2 gr glikoz ve 2.5 gr disodyum fosfat 1 litre distile suda eritilip, pH'ı 7.4'e ayarlandı. 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra, karışım steril cam tüplere dağıtıldı.



Resim 3. Penisilin direncinin mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. Kuyucuklarda bulanıklığın görülmesi üremenin varlığını gösterir. 1 no'lu suşun penisilin MİK değeri 32 mcg/ml'dir.

Duyarlılık testi, 100 mikrolitre alan U tabanlı steril mikroplaklar kullanılarak yapıldı. Tüm çukurlara 100 mikrolitre MH broth (gentamisin ve streptomisin için BHI broth) dağıtıldı. İlk çukurlara,

Ağırlık (mg) = Hacim (ml) x Konsantrasyon (mcg/ml) / Antibiyotik potensi (mcg/ml)

formülü kullanılarak hazırlanan antibiyotik stok solüsyonundan 100 mikrolitre konuldu ve seri sulandırım yapıldı (108). Her çukurda 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan tüm çukurlara 5 mikrolitre dağıtıldı. Bu amaçla, 0.5 McFarland standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonu (10^8 CFU/ml), 1/10 oranında sulandırıldı. Her plağa, antibiyotik içermeyen üreme kontrolü (bakteri + besiyeri) ve besiyeri kontrolü (besiyeri) konuldu. Mikroplakların üstleri kapatılarak 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. MİK değerleri çıplak gözle okunarak belirlendi.

Tablo 5. MİK yorumlama standartları (109)

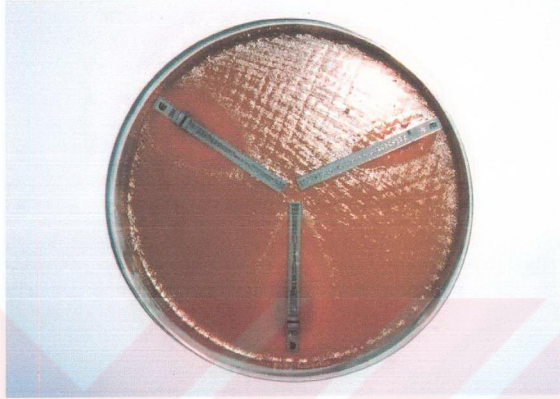
Antibiyotik	MİK ($\mu\text{g/ml}$) yorumlama standartları		
	Duyarlı	Orta Du.	Dirençli
Penisilin	≤ 8	-	≥ 16
Ampisilin	≤ 8	-	≥ 16
Vankomisin	≤ 4	8-16	≥ 32
Gentamisin	< 500	-	≥ 500
Streptomisin	< 1000	-	≥ 1000
Eritromisin	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Tetrasiklin	≤ 4	8	≥ 16
Siprofloksasin	≤ 1	2	≥ 4
Nitrofurantoin	≤ 32	64	≥ 128
Kloramfenikol	≤ 8	16	≥ 32

3.2.4. Agar tarama yöntemi

NCCLS'in önerileri doğrultusunda, 6 mcg/ml vankomisin içeren Brain-Heart Infusion Agar (BHIA), 500 mcg/ml gentamisin içeren BHIA, 2000 mcg/ml streptomisin içeren BHIA besiyerleri hazırlandı.

17.5 gr brain-heart dehidrate ekstraktı, 10 gr meat pepton, 5 gr NaCl, 2 gr glikoz ve 2.5 gr disodyum fosfat 1 litre distile suda eritilip, pH'ı 7.4'e ayarlandı. 121°C 'de 15 dk sterilize edildikten sonra, $45-50^\circ\text{C}$ 'ye soğutulan besiyerine 50 ml defibrinize koyun kanı ve son konsantrasyonu 6 mcg/ml olacak şekilde hazırlanan vankomisin solüsyonu eklendi. Karışım steril petri kutularına döküldü. Aynı şekilde gentamisin 500 mcg/ml ve streptomisin 2000 mcg/ml son konsantrasyon olacak şekilde antibiyotik ilave edildi. 0.5 McFarland bulanıklılığındaki bakteri süspansiyonundan hazırlanan antibiyotikli besiyerlerine 10'ar mikrolitre damlatıldı.

37°C'lik etüvde 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda birden fazla koloninin üremesi durumunda, bakteri suşu ilgili antibiyotiğe dirençli olarak kabul edildi.



Resim 4. Vankomisin , gentamisin, streptomisin direncinin E-test yöntemi ile araştırılması

3.2.5. E-test yöntemi

Bakteri suşlarının, vankomisin, gentamisin ve streptomisine karşı duyarlılıkları, üretici firmanın önerileri doğrultusunda E-test yöntemi ile çalışıldı ve değerlendirme NCCLS kriterlerine göre yapıldı.

Bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerinden hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları, Mueller Hinton agar yüzeyine yayıldı ve E-test stripleri önerilen şekilde besiyerine yerleştirildi. 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra MİK değerleri okundu.

3.3. Beta-laktamaz aktivitesinin araştırılması

Kromojenik bir sefalosporin olan nitrosefin çubukları (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Stick bir damla distile su ile ıslatıldıktan sonra öze ile birkaç koloni alınıp stick üzerinde ezilerek yayıldı. Beş dakikalık süre içinde diskte pembe-kırmızı renk oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Klinik örneklerin bakteriyolojik kültürlerinden üretilen gram pozitif kok morfolojisinde, katalaz negatif, %6.5 NaCl'lü agarda üreyen, eskülini hidrolize eden, PYR testi pozitif, 10°C-45°C'de üreyebilen, streptekok grup latex aglütinasyon testinde D grubu antiserum ile pozitif reaksiyon veren 100 bakteri suşu enterokok olarak tanımlanmıştır.

API Rapid ID 32 Strep kiti ile, 100 enterokok suşunun türlere göre dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir. En sık gözlenen türün *E. faecalis*, ikinci sıklıkta gözlenen türün *E. faecium* olduğu görülmektedir.

Tablo 6. Suşların türlere göre dağılımı

Tür	Sayı (%)
<i>E. faecalis</i>	64 (%64)
<i>E. faecium</i>	28 (%28)
<i>E. casseliflavus</i>	6 (%6)
<i>E. avium</i>	1 (%1)
<i>E. durans</i>	1 (%1)
Toplam	100 (%100)

İncelemeye alınan 100 bakteri suşunun klinik örneklere göre dağılımı Tablo 7'de özetlenmiştir. Buna göre *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin en sık idrar örneklerinden izole edildiği görülmektedir.

Tablo 7. Suşların çeşitli klinik örneklere göre dağılımı

Klinik örnek (100)	Türler				
	<i>E. faecalis</i> (n=64)	<i>E. faecium</i> (n=28)	<i>E. casseliflavus</i> (n=6)	<i>E. avium</i> (n=1)	<i>E. durans</i> (n=1)
İdrar (74)	50	21	2	1	
Kan (20)	10	6	4		
Yara (5)	4	1			
Periton sıvı (1)					1

İzole edilen 100 enterokok suşunda beta-laktamaz enziminin varlığı nitrosefin testi ile araştırılmış, beta-laktamaz üreten suşa rastlanmamıştır.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre, izole edilen 100 enterokok suşunun penisilin, ampisilin, vankomisin, teikoplanin, gentamisin, streptomisin, eritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, norfloksasin, nitrofurantoin, rifampisin ve kloramfenikole karşı duyarlılıkları Tablo 8' de gösterilmiştir.

Tablo 8. Disk difüzyon yöntemine göre saptanmış antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	Orta duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Direnç oranı (%)
Penisilin	72	-	28	% 28
Ampisilin	72	-	28	% 28
Vankomisin	98	2	-	% 0
Teikoplanin	100	-	-	% 0
Gentamisin	77	1	22	% 22
Streptomisin	83	1	16	% 16
Eritromisin	22	40	38	% 38
Tetrasiklin	46	6	48	% 48
Siprofloksasin	63	28	9	% 9
Norfloksasin	86	7	7	% 7
Nitrofurantoin	93	6	1	% 1
Rifampin	8	21	71	% 71
Kloramfenikol	79	8	13	% 13

API ATB Enteroc 5 kitiyle, 100 enterokok suşunun penisilin, ampisilin, vankomisin, teikoplanin, gentamisin, streptomisin, eritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, levofloksasin, nitrofurantoin, rifampisin, kloramfenikol ve kinopristin-dalfopristine karşı duyarlılıkları Tablo 9' de gösterilmiştir.

Tablo 9. API ATB Enteroc 5 kitine göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	Duyarlı suş sayısı	Orta duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Direnç oranı (%)
Penisilin	71	-	29	% 29
Ampisilin	72	-	28	% 28
Vankomisin	99	1	-	% 0
Teikoplanin	100	-	-	% 0
Gentamisin	78	-	22	% 22
Streptomisin	86	-	14	% 14
Eritromisin	19	43	38	% 38
Tetrasiklin	45	1	54	% 54
Siprofloksasin	56	30	14	% 14
Levofloksasin	91	2	7	% 7
Nitrofurantoin	67	26	7	% 7
Rifampin	5	15	80	% 80
Kloramfenikol	73	6	21	%21
Kinopristin	51	3	46	%46

Broth mikrodilüsyon yöntemiyle suşların penisilin, ampisilin, vankomisin, gentamisin, streptomisin, eritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin, nitrofurantoin ve kloramfenikole karşı duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu çalışmada broth mikrodilüsyon yöntemi standart referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Broth mikrodilüsyon ile elde edilen sonuçlar ve direnç oranları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Referans broth mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	MIK ₉₀ (µg/ml)	Duyarlı suş sayısı	Orta duyarlı suş sayısı	Dirençli suş sayısı	Direnç oranı (%)
Penisilin	128	72	-	28	% 28
Ampisilin	64	72	-	28	% 28
Vankomisin	2	99	1	-	% 0
Gentamisin	2000	77	-	23	% 23
Streptomisin	2000	84	-	16	% 16
Eritromisin	32	24	38	38	% 38
Tetrasiklin	32	48	1	51	% 51
Siprofloksasin	4	70	21	9	% 9
Nitrofurantoin	32	90	9	1	% 1
Kloramfenikol	32	77	9	14	% 14

Referans yöntemine göre test sonuçları karşılaştırıldığında, çok büyük (very major) hata (yalancı duyarlılık); dirençli bir suşun duyarlı olarak saptanması, büyük (major) hata (yalancı dirençlilik); duyarlı bir suşun dirençli olarak saptanması, küçük (minör) hata; duyarlı veya dirençli bir suşun orta duyarlı ya da orta duyarlı bir suşun duyarlı veya dirençli olarak saptanması olarak değerlendirilmiştir. Broth mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak, disk difüzyon ile API ATB Enteroc 5 kitinin karşılaştırılması Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Disk difüzyon ile API ATB Enteroc kitinin karşılaştırılması

	Mikrodil.			Disk d.			API			Disk d.			API		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	ÇB	B	K	ÇB	B	K
P	72	-	28	72	-	28	71	-	29	-	-	-	-	1	-
AMP	72	-	28	72	-	28	72	-	28	-	-	-	-	-	-
VA	99	1	-	98	2	-	99	1	-	-	-	1	-	-	-
GN	77	-	23	77	1	22	78	-	22	-	-	1	1	-	-
S	84	-	16	83	1	16	86	-	14	-	-	1	2	-	-
E	24	38	38	22	40	38	19	43	38	-	-	2	1	1	7
TE	48	1	51	46	6	48	45	1	54	-	-	5	-	2	2
ClP	70	21	9	63	28	9	56	30	14	-	-	7	-	1	17
NİT	90	9	1	93	6	1	67	26	7	-	-	3	-	2	15
C	77	9	14	79	8	13	73	6	21	-	-	3	-	-	11

P:penisilin AMP:ampisilin VA:vankomisin GN:gentamisin S:streptomisin
E: eritromisin TE: tetrasiklin ClP: siprofloksasin NİT: nitrofurantoin
C: kloramfenikol ÇB: çok büyük hata B: büyük hata K: küçük hata

Referans broth mikrodilüsyon yöntemine göre, disk difüzyon ile API ATB Enteroc 5 kitinin duyarlılık ve özgüllük oranları Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları

	Disk d (%) [*]		API (%) [*]		Disk d (%) ^{**}		API (%) ^{**}	
	Du.	Öz.	Du.	Öz.	Du.	Öz.	Du.	Öz.
P	100	100	100	98.6	100	100	100	98.6
AMP	100	100	100	100	100	100	100	100
VA	100	100	100	100	100	99	100	100
GN	100	100	95.8	100	95.8	100	95.8	100
S	100	100	88.8	100	100	98.8	88.8	100
E	100	100	97.4	96	100	92.3	95	77.4
TE	100	100	100	96	94.4	96	100	92.3
ClP	100	100	100	98.5	100	90.9	100	79.5
NİT	100	100	100	97.8	25	100	50	84.9
C	100	100	100	100	100	96.2	93.3	88.5

* : Duyarlılık (Du.) ve özgüllük (Öz.) oranları çok büyük ve büyük hatalara göre hesaplanmıştır.

** : Duyarlılık (Du.) ve özgüllük (Öz.) oranları minör hatalar dahil edilerek hesaplanmıştır.

Agar tarama ve E-test yöntemlerine göre, 100 enterokok suşunun vankomisin, gentamisin ve streptomisine karşı duyarlılıkları ve bu yöntemlerin referans broth mikrodilüsyon metoduna göre karşılaştırılmaları tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13. Agar tarama ve E-test yöntemlerinin karşılaştırılması

	Mikrodilüsyon			Agar tarama			E-test			Agar tarama		E-test	
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	Du.	Öz.	Du.	Öz.
VA	99	1	-	100	-	-	99	1	-	100	100	100	100
GN	77	-	23	77	-	23	77	-	23	100	100	100	100
S	84	-	16	84	-	16	84	-	16	100	100	100	100

Enterokok suşlarının türlere göre antibiyotiklere direnç durumları Tablo 14’de özetlenmiştir. *E. faecium* suşlarının *E. faecalis* suşlarına göre tetrasiklin ve kinopristin-dalfopristin dışında tüm antibiyotiklere daha dirençli olduğu saptanmıştır.

Tablo 14. Suşların türlere göre antibiyotiklere direnç durumları

	<i>E. faecalis</i> (n=64)	<i>E. faecium</i> (n=28)	<i>E.casseliflaus</i> (n=6)	<i>E. avium</i> (n=1)	<i>E. durans</i> (n=1)	Toplam (n=100)
P	-	23 (%82)	4 (%66)	-	1 (%100)	28 (%28)
AMP	-	23 (%82)	4 (%66)	-	1 (%100)	28 (%28)
VA	-	-	-	-	-	0 (%0)
TEC	-	-	-	-	-	0 (%0)
GN	4 (%6)	14 (%50)	4 (%66)	-	1 (%100)	23 (%23)
S	6 (%9)	9 (%32)	-	1 (%100)	-	16 (%16)
E	19 (%29.6)	14 (%50)	3 (%50)	1 (%100)	1 (%100)	38 (%38)
TE	41 (%68.3)	9 (%32)	-	1 (%100)	-	51 (%51)
CİP	4 (%6.2)	5 (%17.8)	-	-	-	9 (%9)
NOR	4 (%6.2)	3 (%10.7)	-	-	-	7 (%7)
LEVO	3 (%4.6)	4 (%14.2)	-	-	-	7 (%7)
NİT	-	1 (%3.5)	-	-	-	1 (%1)
C	9 (%14)	4 (%14.2)	1 (%16.6)	-	-	14 (%14)
RİF	36 (%56)	28 (%100)	6 (%100)	-	1 (%100)	71 (%71)
KİNO	46 (%71.6)	-	-	-	-	46 (%46)

Norfloksasin (NOR) ve rifampin (RİF) sonuçları disk difüzyon yöntemine, levofloksasin (LEVO) ve kinopristin-dalfopristin (KİNO) sonuçları API ATB Enteroc 5 kitine, diğer sonuçlar referans broth mikrodilüsyon yöntemine göre verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Normal floranın fırsatçı patojenleri olarak tanınan enterokoklar, son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak giderek daha sık karşılaşılan ve aynı zamanda antimikrobiyal maddelere direnç oranlarında önemli artışlar kaydedilen bakterilerdir (36, 37, 92). En sık olarak üriner sistem infeksiyonlarına, karın içi infeksiyonlara ve bakteriyemiye neden olmaktadır (2). Birçok merkezde, enterokoklar nozokomiyal infeksiyonların en yaygın ikinci etkeni, nozokomiyal bakteriyeminin ise en yaygın üçüncü etkeni olarak izole edilmektedirler. Vankomisin direncinin görülmesi, yüksek düzey aminoglikozid direncinin giderek yaygınlaşması, bu bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisini oldukça güçleştirmektedir (36, 67).

İnfeksiyon etkeni olan enterokokların %80-90'ını *E. faecalis*, %5-10'unu *E. faecium* oluşturmaktadır. *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus* gibi diğer türler klinik örneklerden nadiren izole edilmektedir (1, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 24).

Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 enterokok suşunun 64'ü *E. faecalis* (%64), 28'i *E. faecium* (%28), 6'sı *E. casseliflavus* (%6), 1'i *E. avium* (%1), 1'i de *E. durans* (%1) olarak tiplendirilmiştir. En sık saptanan tür *E. faecalis*, ikinci sıklıkta saptanan tür *E. faecium* olmuştur. Suşların muayene maddelerine göre dağılımı incelendiğinde, %74'ünün idrardan, %20'sinin kandan, %5'inin yaradan, %1'inin ise periton sıvısından izole edildiği gözlenmiştir. Suşların en sık idrardan, ikinci sıklıkta kandan izole edildiği görülmektedir.

Akıncı ve arkadaşları (110), yaptıkları bir çalışmada %68.6'sı idrar, %20'si yara, %3'ü kan, %2.8'si plevral sıvı, birer tanesi dren mayi, perianal abse ve safra kültürlerinden olmak üzere toplam 70 enterokok suşunun 47'sini *E. faecalis* (%67.2), 20'sini *E. faecium* (%28.6), 2'sini *E. gallinarum* (%2.8) olarak tiplendirmişlerdir. Ögünç ve arkadaşları (72) tarafından yapılan çalışmada, 100 enterokok suşunun %72'si *E. faecalis*, %21'i *E. faecium* ve %7'si *E. casseliflavus* olarak saptanmıştır. Hoşgör ve arkadaşları (70), çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 127 enterokok kökeninden 87'sini (%68.5) *E. faecalis*, 40'nı (%31.5) *E. faecium* olarak tanımlamışlardır. Ünlü ve arkadaşları (58), %60'ı idrar, %28'i yara, %5'i dren olmak üzere çeşitli örneklerden izole ettikleri enterokok suşlarının %78'ini *E. faecalis*, %26'sını *E. faecium* olarak tanımlamışlardır. Karadenizli ve arkadaşları (111),

izole ettikleri toplam 144 enterokok suşundan 93'ünü (%64.6) *E. faecalis*, 43'ünü (%29.6) *E. faecium*, 4'ünü *E. durans*, 2'sini *E. raffinosus*, 2'sini *E. casseliflavus* olarak değerlendirmişlerdir. Gordon ve arkadaşları (59), %57'si idrardan, %22'si yara örneklerinden, %10'u kandan olmak üzere toplam 632 enterokok suşunun %90'ını *E. faecalis*, %8'sini *E. faecium*, %2'sini diğer enterokok türleri olarak tanımlamışlardır. Schouten ve arkadaşları (112)'nin Avrupa VRE çalışma grubu ile birlikte yürüttükleri bir çalışmada, 27 Avrupa ülkesinden izole ettikleri 4208 enterokok suşunun %83'ünü *E. faecalis*, %13.6'sını *E. faecium* olarak saptamışlardır.

İncelenen kaynaklar doğrultusunda, bizim çalışmamızda izole edilen enterokok suşlarının muayene maddelerine göre dağılımı ve tür düzeyindeki tanımları literatürlerde bildirilen değerlere oldukça yakındır.

Enterokoklar, birçok antibiyotiğe karşı intrinsik veya kazanılmış dirence sahiptirler. Glikopeptid antibiyotiklere ve yüksek düzeyde aminoglikozidlere karşı kazanılmış direnç ile birlikte çoklu antibiyotik direncine sahip suşların son yıllarda artması nedeniyle, bu bakterilerin dirençleri ile ilgili olarak yurt içi ve yurt dışı pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda dirençlerin tespitinde çeşitli yöntemler kullanılmış, en uygun yöntem tespit edilmeye çalışılmıştır (9, 10, 11).

Chiew ve arkadaşları (113), izole ettikleri enterokok suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direncini agar tarama, broth mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle araştırmışlar, disk difüzyon sonuçlarının referans agar tarama yöntemiyle tam bir uyum gösterdiğini, broth mikrodilüsyon yönteminin YDGD'ni ve YDSD'ni sırasıyla %100, %90 duyarlılık ve % 100 özgülük ile saptadığını belirtmişlerdir.

Louie ve arkadaşları (114), standart broth mikrodilüsyon yöntemini referans olarak MicroScan Pos MIC Type 6 Panel ve AMS-Vitek Gram-Positive Susceptibility Card'ın ampisilin direncini saptama duyarlılığını ve agar tarama metodunu referans olarak bu otomatize yöntemlerin yüksek düzey aminoglikozid direncini saptama duyarlılığını araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, MicroScan paneli yüksek düzey gentamisin direncini saptamada %42 duyarlılık gösterirken, yüksek düzey streptomisin direncini saptamada %64 duyarlılık göstermiş, AMS-Vitek Gram Positive card yüksek düzey gentamisin direncini saptamada %95 duyarlılık gösterirken streptomisin direncini saptamada %82 duyarlılık göstermiştir. MicroScan

paneli, 23 ampiciline dirençli *E. faecium* izolatından 14'ünü, AMS-Vitek card ise 20'sini doğru bir şekilde saptayabilmiştir. Bu çalışmaya göre, ampicilin ve yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada, MicroScan Pos MIC Type 6 Panel ve AMS-Vitek Gram-Positive card kullanımının uygun olmadığı ve alternatif test metodlarının kullanılması önerilmiştir.

Sahm ve arkadaşları (77), 107 *E. faecalis* suşunda yüksek düzey aminoglikozid direncini yedi farklı yöntemle araştırmışlar, standart agar tarama metodu ile yüksek içerikli disk difüzyon yöntemi arasında %100 uyum olduğunu saptamışlardır. MicroScan MIC panelleri, Vitek GPS-TA card gibi otomatize yöntemlerin dirençli suşları saptamada duyarlılıklarının düşük olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, çalışmada yüksek düzey streptomisin direncini araştırırken inkübasyon süresini 24 saatten 48 saate uzatmanın yalancı duyarlı sonuçları minimum düzeye indirgeyeceği belirtilmiştir.

Schulz ve arkadaşları (85), ampicilin, vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada E-test'in güvenilirliğini agar dilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırmışlar ve iki testte benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca, ampicilin direncini saptamada disk difüzyon yönteminin E-test yöntemi kadar güvenilir olduğunu tespit etmişlerdir. Vankomisine orta duyarlı suşları saptamada E-test'in disk difüzyona göre daha duyarlı olduğunu ve E-test ile yüksek düzey streptomisin direncini araştırırken düşük düzeyli strip (1024 mcg) kullanmanın yalancı duyarlı sonuçları önleyeceğini belirtmişlerdir.

Sanchez ve arkadaşları (86), standart agar dilüsyon metodunu referans alarak, E-testin yüksek düzey aminoglikozid direncini saptama yeteneğini araştırmışlar ve agar dilüsyon yöntemi ile %100 uyum gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Nicastri ve arkadaşları (115), agar tarama test sonuçlarını standart referans broth mikrodilüsyon sonuçları ile karşılaştırdıklarında, agar tarama yönteminin enterokok suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada güvenilir bir şekilde kullanabileceğini tespit etmişlerdir.

Endtz ve arkadaşları (75), VanA, VanB, VanC₁, VanC₂ genlerini içeren birbirinden genetik olarak farklı 145 vankomisine dirençli enterokok kolleksiyonunu kullanarak yaptıkları bir çalışmada, enterokoklarda vankomisin direncini saptayan agar dilüsyon, disk difüzyon, E-test, agar tarama, Vitek GPS-TA ve GPS-101,

MicroScan overnight ve rapid panellerinden oluşan sekiz farklı yöntemi karşılaştırmışlardır. VanA tipi direncin bütün yöntemler tarafından aynı güvenilirlikte saptandığını, ancak özellikle Vitek GPS-TA ve MicroScan rapid yöntemlerinin VanB tipi direnci saptamada başarısız olduklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, E-test ve agar tarama yöntemlerinin VanC₁/C₂ genotipleri de dahil tüm VRE'leri saptayan yegane iki metod oldukları bildirilmiştir.

Willey ve arkadaşları (76), yaptıkları bir çalışmada enterokoklarda vankomisin direncinin saptanmasında kullanılan disk difüzyon, Vitek GPS-TA card, MicroScan POS MIC type 6 paneli, agar tarama metodlarının sonuçlarını referans broth mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Vitek card %72 duyarlı ve %100 özgül iken MicroScan paneli %93 duyarlı ve %98 özgül, agar tarama metodu ise %100 duyarlı ve özgül bulunmuştur. Disk difüzyon yönteminde ise %5.8 oranında minör hataya rastlanmış ve bu oranın NCCLS kriterlerine göre kabul edilebilir olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, disk difüzyon ve agar tarama metodlarının vankomisin direncinin saptanmasında en güvenilir metodlar olduğu vurgulanmıştır. Swenson ve arkadaşları (154), yaptıkları bir çalışmada Willey ve arkadaşları tarafından önerilen agar tarama metodu için optimum test koşullarını belirlemeyi amaçlamışlar ve bu metodun duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %96-99 olarak bulmuşlardır.

Tenover ve arkadaşları (81) tarafından yapılan bir çalışmada, Vitek, MicroScan, Uniscept, Autobach, MicroMedia gibi otomatize ve nonotomatize ticari antimikrobiyal duyarlılık testleri ile disk difüzyon yönteminin VanB veya VanC tipi direnç fenotipine sahip VRE'leri saptamada yetersiz oldukları tespit edilmiş ve agar tarama metodunun farklı direnç fenotiplerinde aynı derecede güvenilir olduğu belirtilmiştir.

Kohner ve arkadaşları (79) yaptıkları bir çalışmada, agar dilüsyon, broth mikrodilüsyon, E-test, agar tarama, disk difüzyon ve otomatize Vitek metodlarının vankomisin direncini saptamadaki başarılarını araştırmışlardır. Disk difüzyon ve Vitek metodlarının bu konudaki yetersizliği belirtilmiş, agar tarama yönteminin VanC direnç fenotipli suşları doğru bir şekilde saptamayamadığı vurgulanmıştır. Sonuç olarak, enterokoklarda vankomisin direncini saptamada en uygun metodların broth mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test yöntemleri olduğu belirtilmiştir.

Tenover ve arkadaşları (78), enterokoklardaki vankomisin direncini agar dilüsyon, agar tarama, disk difüzyon ve Sceptor, MicroMedia, Pasco, Sensititre, Alamar, Uniscept, E-test, MicroScan overnight paneli, Vitek, MicroScan rapid panellerini kapsayan ticari test sistemleri ile araştırmışlar, elde edilen sonuçları referans broth mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırmışlardır. Disk difüzyon, Alamar, Uniscept, MicroScan overnight paneli ile sırasıyla %12, %16, %16, %16 oranında küçük hata oranları saptanırken, Vitek ve MicroScan rapid paneli gibi otomatize sistemlerde sırasıyla %10.3, %20.7 oranında çok büyük hata oranları saptanmıştır. Sceptor, MicroMedia, Pasco, Sensititre gibi broth bazlı ticari mikrodilüsyon yöntemleri, agar dilüsyon metodu ve E-test yöntemi ile olumlu sonuçlar elde edilmiş, %6 oranında küçük hata oranları saptanırken, çok büyük veya büyük hataya rastlanmamıştır.

Van Horn ve arkadaşları (116), VRE'lerin izolasyonu için farklı bir yöntem denemişler ve enterokoklar için selektif olan Enterococcosel ve M-Enterococcosel broth besiyerlerine 6 mcg/ml vankomisin ekleyerek VRE'leri izole etmeye çalışmışlardır. Sonuç olarak, vankomisin eklenmiş Enterococcosel broth kullanımının VRE'lerin saptanmasında selektif ve hızlı bir izolasyon sağladığı belirtilmiştir.

Öğünç ve arkadaşları (72), yüksek düzey aminoglikozid direncinin saptanmasında disk difüzyon ve E-test sonuçlarını referans sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla karşılaştırmışlar ve her iki testin sonuçlarını sıvı mikrodilüsyon sonuçlarıyla %99 oranında uyumlu bularak, disk difüzyon testinin yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada uygulanımı kolay, hızlı, güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Gökahmetoğlu ve arkadaşları (36), kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarında, vankomisin direncini E-test ile, yüksek düzey aminoglikozid direncini ise E-test ve disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Disk difüzyon sonuçlarını E-test sonuçlarıyla karşılaştırdıklarında, enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci saptanırken 120 mcg gentamisin ve 300 mcg streptomisin içeren diskler kullanılarak yapılan disk difüzyon yönteminin ucuz ve uygun bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir.

Erbek ve arkadaşları (46), E-test yöntemini referans alarak, enterokok suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direncini ve glikopeptid direncini agar tarama metodu ile araştırmışlardır. Her iki testin gentamisin ve vankomisin direncini saptamada tam uyum gösterdiğini, ancak streptomisin için agar tarama metodu ile dirençli bulunan üç suşun E-test ile duyarlı bulunduğunu saptamışlardır.

Çınar ve arkadaşları (117), çeşitli klinik materyallerden izole ettikleri 111 enterokok kökeninde yüksek düzey aminoglikozid direncini broth mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemleriyle çalışmışlar ve her iki yöntem arasında %100 uyum bularak, agar tarama testinin yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada rutin laboratuvar pratiğinde güvenle kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, broth mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak, vankomisin direncini saptamada disk difüzyon, API ATB Enteroc 5, agar tarama ve E-test yöntemleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinde birer küçük hata saptanırken, API ATB Enteroc 5 ve E-test sonuçlarının referans mikrodilüsyon sonuçlarıyla %100 uyum gösterdiği saptanmıştır (Tablo 12,13). Çalışmamızda, vankomisine orta duyarlı sadece bir suş saptanmış, vankomisine dirençli suşa rastlanmamıştır. Dirençli suşların çok sayıda olmamasından dolayı kullanılan yöntemler arasında tam anlamıyla bir karşılaştırma yapmak doğru olmasa da, çalışmada test edilen tüm yöntemlerin vankomisin duyarlılığını saptamada başarılı olduğu belirtilmelidir.

Enterokok suşlarında yüksek düzey aminoglikozid direnci araştırılırken, disk difüzyon, API ATB Enteroc 5, agar tarama ve E-test yöntemleri ile elde edilen sonuçlar referans broth mikrodilüsyon sonuçları ile karşılaştırıldığında, agar tarama ve E-test yöntemleriyle referans yöntem arasında tam bir uyum olduğu gözlenmiştir (Tablo 13). Disk difüzyon yöntemi ile gentamisin ve streptomisin dirençlerini saptamada birer küçük hata tespit edilirken, API ATB Enteroc 5 ile gentamisin direncini saptamada bir çok büyük hata, streptomisin direncini saptamada ise iki çok büyük hata tespit edilmiştir (Tablo 11). Bu sonuçlara göre, enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direncini saptamada, yüksek içerikli disk difüzyon yöntemi, agar tarama ve E-test yöntemlerinin güvenilir yöntemler olduğu belirtilmelidir. API ATB Enteroc 5 yöntemi, gentamisine ve streptomisine yüksek düzey direncin saptamasında yetersiz kalmaktadır.

Broth mikrodilüsyon sonuçları referans alınarak disk difüzyon ve API ATB Enteroc 5 yöntemleri karşılaştırıldığında, API kitiyle vankomisin, gentamisin, streptomisin dışındaki antibiyotiklere karşı direncin saptanmasında da problemler olduğu görülmektedir (Tablo 11). Her iki yöntemde de küçük hatalar saptanmıştır. Bununla birlikte, API kiti ile penisilin, eritromisin, tetrasiklin, siprofloksasin ve nitrofurantoine karşı dirençlerin saptanmasında büyük hatalar (yalancı direnç) olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, enterokoklarda antibiyotik direncini saptamada API ATB Enteroc 5 kitiyle elde edilen sonuçlar alternatif bir test metodu ile tekrar test edilmelidir.

Çalışmamızda, nitrosefin testi ile test edilen enterokok suşlarının hiçbirinde beta-laktamaz enzimi tespit edilmemiştir. Gordon ve arkadaşları (59), izole ettikleri 705 suş arasında beta-laktamaz üreten 11 *E. faecalis* suşuna (%1.6) rastlamışlardır. Patterson ve arkadaşları (118), yaptıkları çalışmada beta- laktamaz (+) iki enterokok suşu tanımlamışlardır. Jones ve arkadaşları (119), yaklaşık 2000 enterokok suşu arasında beta-laktamaz üreten sadece iki suşa rastlamışlardır. Vandamme ve arkadaşları (120), Udo ve arkadaşları (121), Rouff ve arkadaşları (122), Chiew ve arkadaşları (113), Bryce ve arkadaşları (123), Hsieh (124), Kaufhold ve arkadaşları (125) tarafından yapılan çalışmalarda beta-laktamaz üreten enterokok suşu saptanmamıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, Moaddab ve Töreci (14), Akıncı ve arkadaşları (110), Gökahmetoğlu ve arkadaşları (36), Yazgı ve arkadaşları (126), Çınar ve arkadaşları (117), Karadenizli ve arkadaşları (111) beta-laktamaz üreten enterokok suşuna rastlamamışlardır. Enterokok infeksiyonlarında en sık kullanılan antibiyotiklerden olan penisilin ve ampisiline karşı direncin nedeninin birçok araştırmada olduğu gibi bu çalışmada da beta-laktamaz aktivitesine bağlı olmadığı bir kez daha belirlenmiştir.

Enterokok infeksiyonlarında, uzun yıllardan beri en sık kullanılan beta-laktam antibiyotikler penisilin ve ampisilindir. Enterokoklar, streptokoklardan farklı olarak penisilinlere, sefalosporinlere, monobaktamlara intrinsik olarak dirençlidirler (1, 10, 13, 24).

Çalışmamızda, penisiline ve ampisiline %28 oranında direnç saptanmıştır. *E. faecalis* suşlarında penisilin veya ampisilin direncine rastlanmazken, direnç saptanan 28 suştan 23'ü *E. faecium*, 4'ü *E. casseliflavus*, 1'i *E. durans* olmuştur. Penisilin

direnci saptanan suşların tümünde aynı şekilde ampisilin direncine rastlanmıştır. Ampisilinin MİK₉₀ değeri (64 mcg/ml), penisilinin MİK₉₀ değerinden (128 mcg/ml) bir dilüsyon daha düşük olarak bulunmuştur. Kaufhold ve Klein (125), ampisiline %3.8 oranında, Vandamme ve arkadaşları (120), penisiline %3.8 ve ampisiline %2.1 oranında, Venditti ve arkadaşları (66) ampisiline %16.8 oranında, Bryce ve arkadaşları (123) ampisiline %2.9 oranında, Chirurugi ve arkadaşları (127) ampisiline %23 oranında, Gray ve arkadaşları (128), ampisiline %11.4 oranında, Gordon ve arkadaşları (59), *E. faecalis* suşlarında penisiline ve ampisiline direnç saptamazlarken, *E. faecium* suşlarında penisiline %59 ve ampisiline %41 oranında direnç saptamışlardır. Silverman ve arkadaşları (129), *E. faecalis* suşlarında %3, *E. faecium* suşlarında ise %23 oranında ampisilin direnci saptamışlardır.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, Ulusoy ve arkadaşları (3), idrar örneklerinden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarında, penisiline %14 ve ampisiline %9 oranında, Moaddab ve arkadaşları (14), penisiline %28 ve ampisiline %22 oranında, Ünlü ve arkadaşları (58), *E. faecalis* suşlarında penisiline ve ampisiline %11 oranında, *E. faecium* suşlarında penisiline %77 ve ampisiline %65 oranında, Hoşgör ve arkadaşları (45), yüksek düzey aminoglikozid direnci gösteren *E. faecalis* suşlarında penisiline %20 ve ampisiline % 0 oranında, Çınar ve arkadaşları (48) penisiline %52.3 oranında, Akıncı ve arkadaşları (110), penisiline ve ampisiline %21.4 oranında, Kocagöz ve arkadaşları (130), ampisiline %72 oranında, Bakır ve arkadaşları (131) ampisiline %83.7, Gülsoy ve arkadaşları (4), penisiline %25 oranında direnç saptamışlardır. İncelenen kaynaklar doğrultusunda, elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgisi ile uyum göstermektedir.

Glikopeptidlerden vankomisin ve teikoplanine dirençli suşlar gün geçtikçe daha fazla sayıda bildirilmekte ise de, enterokokların neden olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde halen bu antibiyotikler elde mevcut en etkin seçenek olarak yerlerini korumaktadırlar. Çalışmamızda, vankomisine veya teikoplanine dirençli suşa rastlanmamıştır. İzole edilen enterokok suşlarına karşı en etkili antibiyotikler teikoplanin ve vankomisin olarak saptanmıştır.

İlk olarak İngiltere ve Fransa'dan bildirilen VRE suşları günümüzde birçok ülkede infeksiyon ve/veya kolonizasyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (41, 52, 53, 132). Vandamme ve arkadaşları (120), Belçika'da yaptıkları bir çalışmada, izole

ettikleri 472 enterokok suşunda %1.5 oranında vankomisine direnç saptamışlardır. Dirençli olan yedi suşun tamamı *E. faecium* olarak tiplendirilmiştir. Gordon ve arkadaşları (59), ABD’de altı farklı coğrafik bölgeden elde ettikleri 705 enterokok suşundan sadece iki *E. faecalis* suşunda vankomisine direnç saptamışlardır. Boisivon ve arkadaşlarının (133), Fransa’da 24 hastanede yaptıkları bir çalışmada, yoğun bakım ünitelerinde yatan 647 hastadan elde ettikleri rektal sürüntü örneklerinde 32 VRE suşuna (% 4.9) rastlamışlardır. Pesce ve arkadaşları (134), tarafından İtalya’da yapılan çok merkezli bir çalışmada 4554 *E. faecalis* suşunun 4’ü ve 316 *E. faecium* suşunun 4’ü vankomisine dirençli bulunmuştur. Venditti ve arkadaşları (66), çalıştıkları 101 enterokok suşunun sadece birinde vankomisin direnci ile karşılaşmışlardır. Endtz ve arkadaşları (135), Hollanda’da yaptıkları çalışmada yatan hastaların gaitalarında %2 oranında VRE kolonizasyonu saptamışlardır. Fontana ve arkadaşları (136), 16226 enterokok suşu arasında vankomisin direncini *E. faecalis* için %1.1, *E. faecium* için %8.5 olarak bulmuşlardır. Jones ve arkadaşları (87), yaklaşık 2000 enterokok suşunun 87’sinde (%4.4) vankomisine direnç saptamışlardır. Udo ve arkadaşları (121), yaptıkları çalışmada enterokok suşlarında vankomisin direncini %3, teikoplanin direncini %2 olarak tespit etmişlerdir. Schouten ve arkadaşları (112), 27 Avrupa ülkesinde 49 laboratuvarından elde ettikleri 4208 enterokok suşu ile yaptıkları çalışmada, Avrupa’da VRE prevalansını %2.2 olarak bulmuşlardır.

Ülkemizde ise vankomisine dirençli ilk enterokok suşu, Vural ve arkadaşları (37) tarafından 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi’nden bildirilmiştir. *E. faecium* olarak tanımlanan suş, malign histiositosisli onbir aylık bir erkek çocuktan farklı zamanlarda alınan iki plevra sıvısı örneğinden izole edilmiştir. Aynı yıl içinde, Hoşoğlu ve arkadaşları (35), Dicle Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi’nde menenjit tanısı konulan onbeş yaşındaki bir erkek çocuğunun BOS kültüründe vankomisine dirençli enterokok suşuna rastlamışlardır. Bu bildirimlerin ardından, 1999 yılında İstanbul Tıp Fakültesi’nde Öngen ve arkadaşları (92), VanA geni taşıdığı belirlenen vankomisine ve teikoplanine dirençli bir *E. faecium* suşu izole etmişlerdir. Yüce ve arkadaşları (104), Dokuz Eylül Üniversitesi’nde yenidoğanlardan elde ettikleri 110 rektal sürüntü örneğinin sekizinde vankomisine dirençli enterokok saptamışlardır. Durmaz ve arkadaşları (105), Osmangazi Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi’nde yatan

hematolojik malignensili 150 hastanın dışkı örneklerinde VRE kolonizasyon sıklığını araştırmışlar ve iki hastadan vankomisine dirençli *E. faecium* suşu izole etmişlerdir. Erbek ve arkadaşları (46), Uludağ Ü. Tıp Fakültesi'nde yaptıkları bir çalışmada, yatan hastaların dışkı örneklerinden elde ettikleri 126 enterokok suşunun dokuzunda vankomisine direnç saptamışlardır. Ertek ve arkadaşları (137), Atatürk Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastalarda %19,1 oranında VRE kolonizasyonu saptamışlardır. Çolak ve arkadaşları (138) ise, Türkiye'de ilk VRE salgınını Akdeniz Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi'nden bildirmişlerdir. Bununla birlikte, ülkemizde yapılan birçok çalışmada enterokok suşlarında vankomisin direncine rastlanılmamıştır (3, 7, 14, 36, 45, 58, 67, 110, 111, 130, 139-143).

Enterokoklar, aminoglikozidlere intrinsik olarak dirençlidirler. Streptomisin ve kanamisine yüksek düzeyde dirençli (MİK>2000 mcg/ml) enterokok suşları ilk kez 1970 yılında ABD'de, gentamisine yüksek düzeyde dirençli (MİK>500 mcg/ml) suşlar ise ilk kez 1979'da Fransa'da izole edilmiştir (10, 45). Daha sonra dünyanın birçok yerinde ve ülkemizde de yapılan çalışmalarda gentamisin ve streptomisine dirençli enterokok suşlarının varlığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda, incelenen 100 enterokok suşunun 23'ünde yüksek düzeyde gentamisin direnci, 16'sında yüksek düzeyde streptomisin direnci saptanmıştır. YDGD sergileyen 23 suşun 14'ü *E. faecium*, 4'ü *E. faecalis*, 4'ü *E. casseliflavus*, 1'i *E. durans* ve YDSD sergileyen 16 suşun 9'u *E. faecium*, 6'sı *E. faecalis*, 1'i *E. avium* olarak tanımlanmıştır. 3'ü *E. faecalis*, diğer 3'ü *E. faecium* olmak üzere toplam 6 suş hem gentamisine hem de streptomisine dirençli bulunmuştur. Dirençli suşların türlere göre dağılımı incelendiğinde, *E. casseliflavus* suşlarının %66'sı, *E. faecium* suşlarının %50'si, *E. faecalis* suşlarının ise %6'sı gentamisine yüksek düzeyde dirençli iken, *E. faecium* suşlarının %32'si ile *E. faecalis* suşlarının %9'u streptomisine yüksek düzeyde dirençli saptanmıştır. *E. faecium* suşlarının *E. faecalis* suşlarına göre gentamisine ve streptomisine daha yüksek oranda direnç gösterdiği gözlenmiştir.

Tablo 15. Çeşitli çalışmalarda enterokoklarda YDGD ve YDSD oranları

Araştırmacılar	YDGD	YDSD	Araştırmacılar	YDGD	YDSD
Vandamme ve ark. (120)	%8.7	%50.8	Nicastri ve ark. (115)	%28	%57
Gordon ve ark. (59)	%22.1	%27.7	Yagupsky ve ark. (74)	%12.9	%32.3
Sanchez ve ark. (86)	%11	%42	Udo ve ark. (121)	%15.9	%21
Guiney ve Urwin (144)	%12.8	-	Haglund ve ark. (147)	%59	-
Ruoff ve ark. (122)	%15.4	-	Bryce ve ark. (123)	%12.1	-
Chiew ve ark. (145)	%43	%38	Gray ve ark. (128)	%6.7	-
Chiew ve ark. (113)	%22	%38	Nachamkin ve ark.(148)	%15.1	-
Spiegel ve ark. (146)	%35	%22	Watanakunakorn (149)	%35	-
Venditti ve ark. (66)	%26.7	%51.4	Silverman ve ark. (129)	%14	-
Hoşgör ve ark. (70)	%23	%20	Ünlü ve ark. (58)	%9	%17.5
Kocagöz ve ark. (130)	%52.5	%54	Erbek ve ark. (46)	%20	%27
Gelişken Akgül (67)	%65	%18	Moaddab ve Töreci(14)	%13	%18
Akıncı ve ark. (110)	%31.4	%22.8	Karadenizli ve ark(111)	%26.4	%22.2
Çınar ve ark. (117)	%50.5	%41.4	Yazgı ve ark. (126)	%25.9	%34.5
Çaylan ve ark. (143)	%33.9	%22.2	Öğünç ve ark. (72)	%30	-
Gökahmetoğlu (36)	%56.6	%60	Çalışmamızda	%23	%16

YDGD: Yüksek düzey gentamisin direnci YDSD: Yüksek düzey streptomisin direnci

Enterokok türlerinde yüksek düzey aminoglikozid direncini araştırmaya yönelik ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalarda elde edilen direnç oranları Tablo 15’de özetlenmiştir. Suş sayıları, izole edildikleri kaynaklar ve bölgeler arasındaki farklar nedeniyle çeşitli çalışmalarda oldukça farklı oranlar verilmiş olup, çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direnç oranları literatürlerde bildirilen oranlar arasındadır.

Kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasinin enterokoklara karşı etkinliği sınırlıdır. Enterokoklara in vitro aktivitesi olmasına rağmen bakterisidal değildir. Enterokokal infeksiyonlar arasında sadece üriner sistem infeksiyonlarında alternatif tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır (110). Türkiye’de Moaddab ve Töreci (14) tarafından yapılan bir çalışmada, klinik örneklerden izole edilen enterokoklarda siprofloksasine direnç oranı %7 olarak bildirilmiştir. Akıncı ve arkadaşları (110), siprofloksasine direnç oranını *E. faecalis* için %2.1 ve *E. faecium* için %65 olarak saptamışlardır. Ünlü ve arkadaşları (58), *E. faecalis* suşlarında siprofloksasine %14,

E. faecium suşlarında ise %38 oranında direnç tespit etmişlerdir. Ulusoy ve arkadaşları (3), idrar yolları infeksiyonlarından izole ettikleri *E. faecalis* suşlarında, diğer bir kinolon grubu antibiyotik olan norfloksasine karşı %23 oranında direnç saptamışlardır. Bakır ve arkadaşları (131), enterokok suşlarında siprofloksasin direncini %9.5 olarak bulmuşlardır. Vandamme ve arkadaşları (120), yaptıkları çalışmada *E. faecalis* suşlarını siprofloksasine karşı %10.2, *E. faecium* suşlarını ise %25.6 oranında dirençli bulmuşlardır. Venditti ve arkadaşları (66), yatan hastalarda çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri enterokok suşlarında siprofloksasin direncini %8.9 oranında saptamışlardır. Schouten ve arkadaşları (63), *E. faecalis* suşlarında siprofloksasin direncini %6, *E. faecium* suşlarında ise %33 olarak belirtmişlerdir. Kaufold ve Klein (125), siprofloksasin direncini %3.8, Udo ve arkadaşları (121) ise %36.1 olarak bulmuşlardır. Hsieh (124) tarafından yapılan çalışmada siprofloksasin direnci %3.1 olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda, izole edilen 100 enterokok suşunda siprofloksasine %9, norfloksasine (disk difüzyon sonuçlarına göre) %7, levofloksasine (API ATB Enteroc 5 kitine göre) %7 oranında direnç saptanmıştır. Siprofloksasine direncin türlere göre dağılımı incelendiğinde, *E. faecium* suşlarının *E. faecalis* suşlarına göre siprofloksasine daha dirençli olduğu görülmektedir (Tablo 14). Çalışmamızda, kinolon grubu antibiyotikler glikopeptidler ve nitrofurantoinen sonra en etkili antibiyotikler olmuştur.

İdrar yolları infeksiyonlarının tedavisinde iyi bir seçenek olan nitrofurantoin karşı çalışmamızda %1 oranında direnç saptanmıştır. Nitrofurantoin, vankomisin ve teikoplaninden sonra en etkili antibiyotik olarak bulunmuştur. Ulusoy ve arkadaşları (3), idrar örneklerinden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarında nitrofurantoin %9 oranında direnç saptamışlardır. Moaddab ve Töreci (14), nitrofurantoin %3 oranında direnç tespit etmiştir. Bu oran, çalışmamızda elde ettiğimiz değere oldukça yakındır. Hoşgör ve arkadaşları (45), aminoglikozidlere yüksek düzeyde direnç gösteren enterokok suşlarında nitrofurantoin direncini araştırmışlar ve *E. faecium* suşlarında %13 oranında direnç saptarlarken, *E. faecalis* suşlarında nitrofurantoin direncine rastlamamışlardır.

İzole ettiğimiz 100 enterokok suşunun diğer antimikrobiyal maddelere karşı direnç durumları incelendiğinde, eritromisine %38, tetrasikline %51, kloramfenikole %14, rifampine (disk difüzyon sonuçlarına göre) %71, kinopristin-dalfopristine (API

ATB Enteroc 5 kitine göre) %46 oranlarında dirence rastlanmıştır. Bu bulgulara göre, enterokok suşlarına karşı en etkisiz antibiyotikler rifampin (%8 duyarlılık), eritromisin (%24 duyarlılık), tetrasiklin (%48 duyarlılık) olmuştur. Kinopristin-dalfopristine dirençli 46 suşun tamamı *E. faecalis* olarak tanımlanmış, *E. faecium* suşlarında bu antibiyotiğe karşı dirence rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda, Mutnick ve arkadaşları (150), kloramfenikole %13, kinopristin-dalfopristine %80, Eliopoulos ve arkadaşları (151) vankomisine dirençli *E. faecium* suşlarında kinopristin-dalfopristine %14.6, Kaufold ve Klein (125) eritromisine %25.4, Giglio ve arkadaşları (152) tetrasikline *E. faecalis* suşlarında %77, *E. faecium* suşlarında %59, Udo ve arkadaşları (121) eritromisine %62.6, tetrasikline %65.1, kloramfenikole %26.1, Schouten ve arkadaşları (63) *E. faecalis* suşlarında eritromisine, kloramfenikole, kinopristin-dalfopristine sırasıyla %47, %25, %75, *E. faecium* suşlarında sırasıyla %75, %26, %8, Ulusoy ve arkadaşları(3), tetrasikline %80, rifampine %100, Moaddab ve Töreci(14), eritromisine %30, Hoşgör ve arkadaşları (45), eritromisine %70, tetrasikline %95, rifampine %100, Baykan (153) eritromisine %55, tetrasikline %52, Ertek ve arkadaşları (137), 13 VRE suşunda eritromisine %62, tetrasikline %69, rifampine %85 oranlarında direnç tespit etmişlerdir.

6. SONUÇ

Isparta bölgesinde enterokok türleri ile yapılan ilk araştırma özelliğini taşıyan bu çalışmada, vankomisin direncine rastlanılmaması, ülkemizden giderek artan oranda VRE suşlarının bildirildiği bir dönemde oldukça sevindiricidir. Bununla birlikte, izole edilen tüm suşlarda glikopeptid duyarlılığının araştırılması ortaya çıkacak glikopeptid direncinin erken tanınması açısından yararlı olacaktır.

İzole edilen bakteri suşlarında beta-laktamlara, yüksek düzeyde aminoglikozidlere ve diğer antibiyotiklere karşı direncin saptanması ve türler arasında farklı direnç profillerinin elde edilmesi, enterokok suşlarında tedavi öncesinde kesinlikle tür identifikasyonunun ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bulgularımız, yüksek düzeyde aminoglikozid direncinin saptanmasında, yüksek içerikli disk difüzyon, agar tarama ve E-test yöntemlerinin aynı ölçüde güvenilir olduğunu ve disk difüzyon yönteminin diğerlerine göre uygulanımı kolay, hızlı ve ucuz bir metod olduğunu göstermektedir.

ÖZET

Virülansı düşük mikroorganizmalar olan enterokoklar, son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak giderek daha sık karşılaşılan ve aynı zamanda antimikrobiyal maddelere direnç oranlarında önemli artışlar kaydedilen bakterilerdir. Enterokoklar nozokomiyal infeksiyonların en yaygın ikinci etkeni, nozokomiyal bakteriyeminin ise en yaygın üçüncü etkeni olarak izole edilmektedirler. Vankomisin direncinin ortaya çıkması ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin giderek yaygınlaşması, bu bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisini oldukça güçleştirmektedir.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 enterokok suşunda glikopeptid ve yüksek düzey aminoglikozid direnci disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, agar tarama, E-test, API ATB Enteroc 5 antibiyotik duyarlılık yöntemleriyle araştırılmış ve bu yöntemler karşılaştırılmıştır.

74'ü idrar, 20'si kan, 5'i yara ve 1'i periton sıvısı örneklerinden izole edilen 100 enterokok suşunun, API Rapid ID 32 Strep kitiyle, 64'ü *E. faecalis* (%64), 28'i *E. faecium* (%28), 6'sı *E. casseliflavus* (%6), 1'i *E. avium* (%1), 1'i *E. durans* (%1) olarak tiplendirilmiştir. En sık saptanan tür *E. faecalis*, ikinci sıklıkta saptanan tür *E. faecium* olmuştur. Suşların en sık idrardan, ikinci sıklıkta kandan izole edildiği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, vankomisine orta duyarlı bir suş dışında, tüm suşlar vankomisine ve teikoplanine duyarlı bulunmuştur. İncelenen 100 enterokok suşun 23'ünde yüksek düzey gentamisin direnci, 16'sında yüksek düzey streptomisin direnci saptanmıştır. Suşların %28'inin penisiline ve ampisiline, %38'inin eritromisine, %51'inin tetrasikline, %9'unun siprofloksasine, %1'inin nitrofurantoine, %14'ünün kloramfenikole dirençli olduğu bulunmuştur. *E. faecium* suşlarının *E. faecalis* suşlarına göre hemen hemen tüm antibiyotiklere daha dirençli olduğu saptanmıştır.

İncelenen suşların hiçbirinde beta-laktamaz enzim aktivitesine rastlanmamıştır.

Elde edilen sonuçlar, enterokok suşlarında tedavi öncesinde kesinlikle tür identifikasyonunun ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Yüksek düzey aminoglikozid direncinin saptanmasında, yüksek içerikli

disk difüzyon, agar tarama ve E-test yöntemlerinin aynı ölçüde güvenilir olduğu ve disk difüzyon yönteminin diğerlerine göre uygulanımı kolay, hızlı ve ucuz bir metod olduğu sonucuna varılmıştır.



SUMMARY

THE INVESTIGATION OF GLYCOPEPTIDE AND HIGH-LEVEL AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE IN ENTEROCOCCUS SPECIES IN ISPARTA REGION AND THE COMPARISON OF THE ANTIBIOTIC SENSITIVITY TESTS

Enterococci which have low virulence, are seen widely as nosocomial infection agent and are frequently reported as having more resistance to antimicrobial agents during last years. Enterococci are isolated as the second most common cause of nosocomial infections and as the third most common cause of nosocomial bacteremia. The emergence of vancomycin resistance and the gradually increasing high level aminoglycoside resistance hardened the treatment of the infections due to these bacteria.

In this study, glycopeptide and high level aminoglycoside resistance were investigated and antibiotic susceptibility testing methods were compared among disk diffusion, broth microdilution, agar screen, E-test, API ATB Enteroc 5 methods in 100 enterococci strains isolated from various clinical specimens.

Of the 100 enterococcal strains, 74 strains were isolated from urine, 20 from blood, 5 from wound and 1 from peritoneal fluid specimens. Sixty-four (64%) were identified as *E. faecalis*, 28 (28%) as *E. faecium*, 6 (6%) as *E. casseliflavus*, 1 (1%) as *E. avium*, 1 (1%) as *E. durans* by API Rapid ID 32 Strep kit. The most frequently identified strain was *E. faecalis* and the second was *E. faecium*. The strains were isolated most frequently from urine and secondly from blood.

In this study, except a moderate-susceptible vancomycin strain, all strains were found to be susceptible to vancomycin and teicoplanin. Of the investigated 100 enterococcal strains, high level gentamicin resistance was detected in 23 strains and high level streptomycin resistance was detected in 16 strains. Of the 100 strains, 28%, 38%, 51%, 9%, 1%, 14% of the strains were detected to be resistant to penicillin and ampicillin, erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, nitrofurantoin, chloramphenicol, respectively. *E. faecium* strains were detected more resistant to almost all antibiotics than *E. faecalis* strains.

None of the examined strains was found to have beta-lactamase enzyme activity.

In the view of these results, the species level identification and antibiotic susceptibility tests in enterococcal strains should be absolutely detected before the treatment. High content disk diffusion, agar screen and E-test methods are equally reliable for the detection of high level aminoglycoside resistance and disk diffusion method is a rapid, easy to perform and inexpensive method when compared with the other methods.



KAYNAKLAR

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. The Gram-Positive Cocci Part II: Streptococci, Enterococci and the Streptococcus-like Bacteria. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia. Lippincott Company. 577-649. 1997.
2. Gelişken Akgül S, Sümerkan B. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterokokların biyokimyasal özelliklerine göre tiplendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi. 13 (3): 399-402. 1999.
3. Ulusoy S, Hoşgör M, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A. Üriner sistem infeksiyonlarından soyutlanan E.faecalis kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları. İnfeksiyon Dergisi. 8(3-4): 119-120. 1994.
4. Gülsoy Ö, Kocazeynep B, Arıtürk S. Cerrahi yoğun bakım ünitelerinden izole edilen enterokokların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ile yüksek düzey aminoglikozid direncinin araştırılması. ANKEM Dergisi. 16 (No.1): 96-99. 2002.
5. Erbek S, Özakin C, Gedikoğlu S. Toplum ve hastane kaynaklı olarak dışkıda enterokok türlerinin dağılımı. İnfeksiyon Dergisi. 16 (4): 451-455. 2002.
6. Holm SE, Mascini EM. Streptococci and related genera, volume 2, section 8. In: Armstrong D, Cohen J (eds). Infectious Diseases. 1st ed. London. Mosby. 14.1-14.18. 1999.
7. Zer Y, Bayram A, Balcı İ, Korkmaz G. Hastanede yatan hastalardan izole edilen enterokok suşlarının vankomisine duyarlılıklarının E-test yöntemi ile belirlenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 32: 55-57. 2002.
8. Yücesoy M, Yüce A, Yuluğ N. Enterokok bakteriyemili dokuz olgunun sunumu. İnfeksiyon Dergisi. 10 (4) : 339-342. 1996.
9. Facklam RR, Sahm DF, Teixeira LM. Enterococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington. ASM Press. 297-305. 1999.
10. Murray BE. The Life and Times of the Enterococcus. Clinical Microbiology Reviews. 3:46-65. 1990.
11. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. Clinical Microbiology Reviews. 13:686-707. 2000.
12. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Streptococci and related genera. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. St. Louis, Missouri. Mosby. 333-352. 1994.
13. Murray BE. Enterococci. In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR (eds). Infectious Diseases. 2th ed. Philadelphia. WB Saunders Company. 1723-1730. 1998.
14. Moaddab SR, Töreci K. Enterokok suşlarında tür tayini, vankomisin ve diğer bazı antibiyotiklere direnç aranması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 30: 77-84. 2002.
15. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp. 1. Media for isolation and enumeration. International Journal of Food Microbiology. 1-18. 2003.
16. Parker MT. The enterococci and related grup D streptococci. In: Wilson G, Miles A, Parker MT (eds). Topley's and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 7th ed. London. 198-200. 1983.
17. Holt JG, Krieg NR, Sneath PTH, Staley JT, Williams ST. Gram positive cocci. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. 527-558. 1994.
18. Levinson W, Jawetz E. Gram positive cocci-Streptococcus. Medical Microbiology & Immunology. 4th ed. Stamford, Connecticut. Appleton & Lange. 76-79. 1996.
19. Bilgehan H. Gram olumlu koklar-Streptococcus. Bilgehan H(ed). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3. baskı. İzmir. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları. 506-523. 2002.

20. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Streptococcus ve Enterococcus. Tıbbi Mikrobiyoloji. 9. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri. 227-236. 2001.
21. Cengiz AT. Streptococcus. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara. Güneş Kitabevi. 349-364. 1999.
22. Bilgehan H. Gram olumlu koklar-Streptococcus. Bilgehan H(ed).Klinik Mikrobiyoloji. 10. baskı. İzmir. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları. 273-316. 2000.
23. Sahm DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mundy LM. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 35(8): 2026-2030. 1997.
24. Musher DM. Enterococcus Species and Group D Streptococci. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE (eds). Principles and Practice of Infectious Disease. 3rd ed. New York. Churchill Livingstone Inc. 1550-1554. 1990.
25. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. Clinical Microbiology Reviews. 7(4): 462-478. 1994.
26. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. 13(4): 513-522. 2000.
27. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. 1-24. 2003.
28. Facklam RR, Collins MD. Identification of Enterococcus Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. Journal of Clinical Microbiology. 27: 731-734. 1989.
29. Freney J, Bland S, Etienne J, Desmonceaux M, Boeufgras JM, Fleurette J. Description and Evaluation of the Semiautomated 4-Hour Rapid ID 32 Strep Method for Identification of Streptococci and Members of Related Genera. Journal of Clinical Microbiology. 30: 2657-2661. 1992.
30. Campos JM, Howard BJ. Streptococci and Related Organisms. In: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC (eds). Clinical and Pathogenic Microbiology. 2th ed. St. Louis. Mosby-Year Book. 257-273. 1994.
31. Durmaz B, Durmaz R. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Durmaz R. (ed). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2. baskı. Ankara. Nobel Tıp Kitabevi. 161-168. 2001.
32. Green M, Barbadora K, Donabedian S, Zervos MJ. Comparison of field inversion gel electrophoresis with contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis as a typing method for E. faecium. J Clin Microbiol. 33(6): 1554-1557. 1995.
33. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (eds). Enterococcus and other gram-positive cocci. In: Medical Microbiology. 4th ed. St. Louis. Mosby. 236-239. 2002.
34. Lewis CM, Zervos MJ. Clinical manifestations of enterococcal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 9(2): 112-117. 1990.
35. Hoşoğlu S, Ayaz C, Geyik MF, Demirel M, Boşnak V. Çoklu antibiyotik direnci olan bir enterokok menenjitisi olgusu. İnfeksiyon Dergisi. 12 (2): 233-235. 1998.
36. Gökahmetoğlu S, Sümerkan B, Eşel D, Karagöz S. Kan kültürlerinden izole edilen enterokok suşlarının vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid dirençlerinin araştırılması. ANKEM Dergisi. 13 (No.1): 57-62. 1999.
37. Vural T, Şekercioğlu AO, Ögünç D, Gültekin M, Çolak D, Yeşilipek A, Ünal S, Kocagöz S, Mutlu G. Vankomisine dirençli E. faecium suşu. ANKEM Dergisi. 13 (No.1): 1-4. 1999.
38. Quintiliani R, Sahm DF, Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington. ASM Press. 1505-1525. 1999.
39. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Antimicrobial Susceptibility Testing. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia. 785-856. 1997.

40. Fontana R, Ligozzi M, Pittaluga F, Satta G. Intrinsik penicillin resistance in enterococci. *Microb Drug Resist.* 2 (2): 209-213. 1996.
41. Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis.* 24 (1):80-84. 1997.
42. Fontana R, Canepari P, Lleo MM, Satta G. Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 9(2): 103-105. 1990.
43. Güneri S. Gram-pozitif koklarda antimikrobiyal direncin yol açtığı yeni problemler. *İnfeksiyon Dergisi.* 12 (2): 271-276. 1998.
44. Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special Phenotypic Methods for Detecting Antibacterial Resistance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Clinical Microbiology.* 7th ed. Washington. ASM Press. 1563-1577. 1999.
45. Hoşgör M, Ulusoy S, Özinel MA, Tünger A, Tokbaş A. Aminoglikozidlere yüksek düzeyde direnç gösteren enterokokların değişik antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi.* 8 (3-4): 115-117. 1994.
46. Erbek S, Özakın C, Gedikoğlu S. Enterokok suşlarında saptanan yüksek düzeyli aminoglikozid ve glikopeptid direnci. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 6: 142-149. 2002.
47. Patterson JE, Zervos MJ. High-level gentamisin resistance in *Enterococcus*: microbiology, genetic basis and epidemiology. *Rev Infect Dis.* 12(4): 644-652. 1990.
48. Çınar T, Leblebicioğlu H, Sünbül M, Eroğlu C, Esen Ş, Günaydın M. Enterokoklarda penisilin-aminoglikozid sinerjisinin araştırılması. *KLİMİK dergisi.* 12(1): 39-42. 1999.
49. Mederski-Samoraj BD, Murray BE. High-level resistance to gentamisin in clinical isolates of enterococci. *J Infect Dis.* 147(4): 751-757. 1983.
50. Malathum K, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resistances Updates.* 2: 224-243. 1999.
51. Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. Ustaçelebi Ş (ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* 1. baskı. Ankara. Güneş Kitabevi. 91-108. 1999.
52. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-Resistant Enterococci. *The Lancet.* 2/9: 57-58. 1988.
53. Kaplan AH, Gilligan PH, Facklam RR. Recovery of Resistant Enterococci during Vancomycin Prophylaxis. *Journal of Clinical Microbiology.* 26: 1216-1218. 1988.
54. Dutka-Malen S, Leclercq R, Coutant V, Duval J, Courvalin P. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(10):1875-1879. 1990.
55. Johnson AP, Uttley AH, Woodford N, George RC. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin Microbiol Rev.* 3(3):280-291. 1990.
56. Töreci K, Ünal S. Glikopeptid Antibiyotikler: Dünü, Bugünü, Yarını. *ANKEM Derg.* 13 (No.3): 271-280. 1999.
57. Woodfort N, Johnson AP, Morrison D, Speller DCE. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 8(4): 585-615. 1995.
58. Ünlü M, Vardar-Ünlü G, Bakıcı MZ, Şahin A. Klinik örneklerden soyutlanan *E. faecalis* ve *E. faecium* kökenlerinin çeşitli antibiyotiklere direnci. *İnfeksiyon Dergisi.* 16 (4): 471-475. 2002.
59. Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, Thornsberry C, Jarvis WR, Tenover FC. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Common and Unusual Species of Enterococci Causing Infections in the United States. *Journal of Clinical Microbiology.* 30: 2373-2378. 1992.
60. Çetinkaya Y, Ünal S. Glikopeptid Antibiyotikler-Vankomisin ve Teikoplanin. *Flora.* 2: No. 1 ek). 3-14. 1997.
61. Felmingham D, Wilson AP, Quintana AI, Gruneberg RN. Enterococcus species in urinary tract infection. *Clin Infect Dis.* 15(2): 295-301. 1992.

62. Landman D, Quale JM. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 40: 161-170. 1997.
63. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JAA and the European VRE Study Group. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(10): 2542-2546. 1999.
64. Ermertcan Ş. İlk parenteral streptogramin: kinopristin/dalfopristin. *İnfeksiyon Dergisi*. 17(3): 369-373. 2003.
65. Kurt Ö, Tekeli E. Gram positive bakteri infeksiyonlarında yeni ilaçlar. *Flora*. 7 (No: 2) 71-80. 2002.
66. Venditti M, Tarasi A, Gelfusa V, Nicastrì E et al. Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 37(5): 1190-1192. 1993.
67. Gelişken Akgül S, Sümerkan B. Enterokok türlerinde vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid direncinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*. 13 (1): 67-70. 1999.
68. Hindler JA, Howard BJ, Keiser JF. Antimicrobial Agents and Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Howard BJ, Keiser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC (eds). *Clinical and Pathogenic Microbiology*. 2th ed. St. Louis. Mosby-Year Book. 145-195. 1994.
69. Swenson JM, Ferraro MJ, Sahm DF, Tenover FC. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. NCCLS Study Group on Enterococci. *J Clin Microbiol*. 33(11): 3008-3018. 1995.
70. Hoşgör M, Çavuşoğlu C, Tünger A, Özinel MA. Enterokoklarda Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci. *İnfeksiyon Dergisi*. 11 (1): 7-9. 1997.
71. Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları; Onikinci bilgi eki. M100-S12. Cilt 22: Sayı 1. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002.
72. Ögünç D, Öngüt G, Saygan MB, Çolak D, Gültekin M. Enterokok türlerinde yüksek düzey gentamisin direncinin saptanmasında değişik yöntemlerin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*. 15 (1): 83-86. 2001.
73. Zervos MJ, Patterson JE, Edberg S, Pierson C et al. Single-concentration broth microdilution test for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol*. 25(12): 2443-2444. 1987.
74. Yagupsky P, Petry S, Menegus MA. Comparison of four methods for testing high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 9(2): 133-135. 1990.
75. Endtz HP, Van den Braak N, Van Belkum A, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, Verburg HA. Comparison of Eight Methods to Detect Vancomycin Resistance in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 592-594. 1998.
76. Willey BM, Kreiswirth BN, Simor AE, Williams G, Scriver SR, Phillips A, Low DE. Detection of Vancomycin Resistance in Enterococcus Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 1621-1624. 1992.
77. Sahm DF, Boonlayangoor S, Iwen PC, Baade JL, Woods GL. Factors Influencing Determination of High-Level Aminoglycoside Resistance in Enterococcus faecalis. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 1934-1939. 1991.
78. Tenover FC, Swenson JM, O'Hara CM, Stocker SA. Ability of Commercial and Reference Antimicrobial Susceptibility Testing Methods to Detect Vancomycin Resistance in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 1524-1527. 1995.
79. Kohner PC, Patel R, Uhl JR, Garin KM, Hopkins MK, Wegener LT, Cockerill FR. Comparison of Agar Dilution, Broth Microdilution, E-test, Disk Diffusion and Automated Vitek Methods for Testing Susceptibilities of Enterococcus spp. to Vancomycin. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 3258-3263. 1997.

98. Gündeş S, Willke A, Karadenizli A, Ateş B. Kocaeli Üniversitesi Hastanesi'nde ilk vankomisine dirençli enterokok izolasyonunu takiben yapılan nokta prevalansı çalışması sonuçları. KLİMİK dergisi. 15(3): 78-81. 2002.
99. Aydoğan H, Beşirbellioğlu B, Alaca R, Başustaoğlu A, Dizer U, Özyurt M. GATA'da izole edilen ikinci glikopeptid dirençli *E. faecium*. Gülhane Tıp Dergisi. 44(1): 82-85. 2002.
100. Başustaoğlu A, Özyurt M, Beyan C, Altun B, Aydoğan H, Haznedaroğlu T, Ünal S, Yalçın A. Kan kültüründen izole edilen glikopeptid dirençli *E. faecium*. Flora. 5(2): 142-147. 2000.
101. Akıncı E, Kılıç H, Karabiber N, Karahan M, Kocagöz S, Altun B, Ünal S, Gürbüz A. İki hastanın kan kültüründen izole edilen vankomisine dirençli *E. faecium* suşları. Flora. 7(2): 126-128. 2002.
102. Karanfil LV, Murphy M, Josephson A et al. A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiology. 13(4): 195-200. 1992.
103. Lam S, Singer C, Tucci V, Morthland VH, Pfaller MA, Isenberg HD. The challenge of vancomycin-resistant enterococci; a clinical and epidemiologic study. Am J Infect Control. 23(3): 170-180. 1995.
104. Yüce A, Karaman M, Gülay Z, Yuluğ N. Yenidoğanlarda vankomisin dirençli enterokokların fekal taşıyıcılığı. ANKEM Dergisi. 13 (No.1): 7-11. 1999.
105. Durmaz G, Aslan V, Kanan B, Us T, Gülbaş Z, Akgün Y. Hemotolojik malignensili hastalarda vankomisine dirençli enterokok ve metisiline dirençli *S. aureus* kolonizasyon sıklığı ve eradikasyonu. İnfeksiyon Dergisi. 16 (2): 171-174. 2002.
106. Gordts B, van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. J Clin Microbiol. 33(11): 2842-2846. 1995.
107. Durupınar B. Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler. KLİMİK Dergisi. 14(2): 47-56. 2000.
108. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standart. M7-A6. The National Committee for Clinical Laboratory Standarts. 6th edition. Pennsylvania. Vol 23:No 2. 2003.
109. MIC Testing- Supplemental Tables. M100-S13. For use with M7-A6. The National Committee for Clinical Laboratory Standarts. 2003.
110. Akıncı E, Balık İ, Tekeli E. Klinik örneklerinden izole edilen enterokok türlerinin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. Flora. 4 (1): 40-45. 1999.
111. Karadenizli A, Kolaylık F. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen enterokok türleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 32(3-4): 212-215. 2002.
112. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JAA, Voss MA and the European VRE Study Group. Prevalence of VRE in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 19: 816-822. 2000.
113. Chiew YF, Lim SW, Kuah BG, Liew HY. Prevalance in Singapore of enterococci with high-level resistance to aminoglycosides and comparison of three methods for their detection. J Infect. 27(2): 125-131. 1993.
114. Louie M, Simor AE, Szeto S, Patel M et al. Susceptibility testing of clinical isolates of *E. faecium* and *E. faecalis*. J Clin Microbiol. 30(1): 41-45. 1992.
115. Nicastrì E, Tarasi A, Visco Comandini U, Gelfusa V et al. High-level aminoglycoside resistance among enterococci: evaluation of an agar screen susceptibility test. J Chemother. 4(1): 9-11. 1992.
116. Van Horn KG, Gedris CA, Rodney KM. Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. J Clin Microbiol. 34(4): 924-927. 1996.

117. Çınar T, Leblebicioğlu H, Sünbül M, Eroğlu C, Esen Ş, Günaydın M. Enterokoklarda yüksek düzey gentamisin ve streptomisin direncinin araştırılması. *Flora*. 4(2): 114-119. 1999.
118. Patterson JE, Masecar BL, Zervos MJ. Characterization and comparison of two penicillinase-producing strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 32(1): 122-124. 1988.
119. Jones RN, Sader HS, Erwin ME, Anderson SC. Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. I. Prevalance data from 97 medical center surveillance study in the United States. Enterococcus Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 21(2): 82-93. 1995.
120. Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, Pensart N, Ieven M, Pot B, Leclercq R, Goossens H. Survey of Enterococcal Susceptibility Patterns in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2572-2576. 1996.
121. Udo EE, Al-Sweih N, John P, Chugh TD. Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 43: 233-238. 2002.
122. Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3): 435-437. 1990.
123. Bryce EA, Zemcov SJ, Clarke AM. Species identification and antibiotic resistance patterns of the enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 10(9): 745-747. 1991.
124. Hsieh SR. Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. *J Microbiol Immunol Infect*. 33(4): 253-257. 2000.
125. Kaufhold A. Species identification and antibiotic susceptibility of enterococci isolated from clinical specimens of hospitalized patients. *Zentrabl. Bakteriologie*. 282(4): 507-518. 1995.
126. Yazgı H, Ertek M, Uslu H, Kadanalı A. Enterokoklarda yüksek düzey aminoglikozid direnci ile beta laktamaz üretimi ilişkisi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 33: 333-336. 2003.
127. Chirurji VA, Oster SE, Goldberg AA, McCabe RE. Nosocomial acquisition of beta-lactamase negative, ampicillin-resistant enterococcus. *Arch Intern Med*. 152(7): 1457-1461. 1992.
128. Gray JW, Stewart D, Pedler SJ. Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 35(9): 1943-1945. 1991.
129. Silverman J, Thal LA, Perri MB, Bostic G, Zervos MJ. Epidemiologic evaluation of antimicrobial resistance in community acquired enterococci. *J Clin Microbiol*. 36(3): 830-832. 1998.
130. Kocagöz S, Çetinkaya Y, Uzun Ö, Akova M, Haşcelik G, Ünal S. Hastane infeksiyonlarından izole edilmiş stafilocok ve enterokok suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Flora*. 4: 284-287. 1997.
131. Bakır M, Yalçın NA. Nosokomiyal enterokok infeksiyonları. *İnfeksiyon dergisi*. 10(2): 153-156. 1996.
132. Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet*. 10;342(8863): 76-79. 1993.
133. Boisivon A, Thibault M, Leclercq R. Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 3 (2):175-179. 1997.
134. Pesce A, Debbia EA, Toni M, Schito GC. Antibiotic resistance of clinical isolates of *Enterococcus* in Italy. *Clin Infect Dis*. 15(3):490-494. 1992.
135. Endtz HP, van den Braak N, van Belkum A, Klutymans JA et al. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 35(12): 3026-3031. 1997.

136. Fontana R, Ligozzi M, Mazzariol A, Veneri G, Cornaglia G. Resistance of enterococci to ampicillin and glycopeptide antibiotics in Italy. *Clin Infect Dis.* 27(1): 84-86. 1998.
137. Ertek M, Yazgı H, Aktaş AE, Erol S, Taşyaran MA. Vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonu araştırılması ve diğer antimikrobiyallere duyarlılıkları. *İnfeksiyon dergisi.* 17(4): 447-451. 2003.
138. Colak D, Naas T, Gunseren F, Fortineau N, Ogunc D, Gultekin M, Nordmann P. First Outbreak of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Tertiary Hospital in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 50: 397-401. 2002.
139. Kayaokay Y, Haşçelik G, Gür D, Akalin E. Teikoplanin ve Vankomisinin Gram Pozitif Mikroorganizmalara Karşı İn vitro Aktiviteleri. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 25(4): 321-325. 1991.
140. Erdemoğlu A, Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G, Altanlar N, Erdengata D. *S. pyogenes*, *S. agalactiae* ve *E. faecalis* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.* 28(1-4): 64-66. 1998.
141. Özgüneş N, Yazıcı S, Aksoy Y, Sargin F. Enterokoklarda fluorokinolon ve vankomisin direncinin araştırılması. *Göztepe Tıp Dergisi.* 17(1): 33-35. 2002.
142. Özkuyumcu C, Köseoğlu Ö, Günel A. Hastanede yatan hastalarda vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid dirençli enterokok kolonizasyonunun araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 32(3): 185-194. 1998.
143. Çaylan R, Üstünakın M, Kadımov V, Aydın K, Köksal İ. Fekal ve klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi.* 34: 24-28. 2004.
144. Guiney M, Urwin G. Frequency and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of enterococci. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 12 (5): 362-366. 1993.
145. Chiew YF, Tosaka M, Yamane N. Prevalence of enterococcal high-level aminoglycoside resistance in Japan. Comparative detection by three methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 16(2): 145-148. 1993.
146. Spiegel CA. Laboratory detection of high-level aminoglycoside-aminocyclitol resistance in *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 26(11): 2270-2274. 1988.
147. Haglund LA, Flournoy DJ, Gilmore MS, Huycke MM. *Enterococcus*: an old pathogen with new tricks. *J Okla State Med Assoc.* 84(7): 305-309. 1991.
148. Nachamkin I, Axelrod P, Talbot GH, Fischer SH et al. Multiply high-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from patients in a university hospital. *J Clin Microbiol.* 26(7): 1287-1291. 1988.
149. Watanakunakorn C. Rapid increase in the prevalence of high-level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures during 1989-1991. *J Antimicrob Chemother.* 30(3): 289-293. 1992.
150. Mutnick AH, Biedenbach DJ, Jones RN. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *E. faecalis* and *E. faecium* in the Sentry Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 46(1): 63-68. 2003.
151. Eliopoulos GM, Wennersten CB, Gold HS, Schulin T et al. Characterization of vancomycin-resistant *E. faecium* isolates from the United States and their susceptibility in vitro to dalfopristin-quinopristin. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(5): 1088-1092. 1998.
152. Giglio MS, Farias O, Lafourcade M, Pinto ME. Surveillance of gram positive cocci susceptibility to betalactams, glycopeptids and other antimicrobials. *Rev Med Chil.* 127(8): 919-925. 1999.
153. Baykan M. İdrar örneklerinden izole edilen enterokokların invitro antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Genel Tıp Dergisi.* 11(3): 119-121. 2001.
154. Swenson JM, Clark NC, Ferraro MJ, Sahm DF et al. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 32(7): 1700-1704. 1994.