



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEMODİYALİZ ARA YOĞUN BAKIM ÜNİTESİ VE NEFROLOJİ
SERVİSİ HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN VANKOMİSİN
REZİSTAN ENTEROKOK SUŞLARININ DİRENÇ GENLERİNİN
SAPTANMASI VE KLONAL KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ülkü DABAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Yasemin ZER

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.11.14 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Gaziantep

2012

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HEMODİYALİZ ARA YOĞUN BAKIM ÜNİTESİ VE NEFROLOJİ SERVİSİ
HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN VANKOMİSİN REZİSTAN ENTEROKOK
SUŞLARININ DİRENÇ GENLERİNİN SAPTANMASI VE KLONAL
KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÜLKÜ DABAN

Tez Savunma Tarihi:27.06.2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Ayşen BAYRAM

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı V.

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yasemin ZER

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof.Dr. Ayşen BAYRAM

Doç. Dr. İlkey KARAOĞLAN

Doç. Dr. Yasemin ZER

İmzası

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

27.06.2012

Ülkü DABAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında maddi manevi hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, ümitsizliğe düştüğüm anlarda hep yanımda olan ve her türlü sıkıntımı paylaştığım tez danışman hocam Doç. Dr. Yasemin ZER'e eğitim sürecimde deneyimleri ve bilgi birikimleri ile her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım, Prof. Dr. İclal BALCI'ya, Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL'e, Prof. Dr. Ayşen BAYRAM'a, Doç. Dr. Fahriye EKŞİ'ye, yardımları için laboratuvar arkadaşlarıma, Esra KIRKGÖZ ve özellikle de Pınar ARABACI'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini, başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan, tüm zorluklara katlanarak emek harcayan, sevgi ve hoşgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve Samet ALBAYRAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vi
RESİM VE ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi ve Sınıflandırma	3
2.2. Enterokokların Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.2.1. Bazı enterokok türlerinin özellikleri	8
2.2.2. Enterokok tanımlamasında kullanılan testler	9
2.2.2.1. Katalaz testi	9
2.2.2.2. Safra-eskulin testi	9
2.2.2.3. % 6.5' lik NaCl üreme testi	10
2.2.2.4. PYR (pirolidonil-β-naftilamid) testi	10
2.2.2.5. Hareket testi	10
2.3. Virulans Faktörleri	10
2.3.1. Sitolizin	11
2.3.2. Agregasyon faktörü	11
2.3.3. Jelatinaz	12
2.3.4. Ekstraselüler süperoksit	12
2.3.5. Ekstraselüler yüzey proteini	12
2.3.6. Kapsüler polisakkarid antijeni	12
2.3.7. Antibiyotik direnci	12
2.3.8. Biyofilm	13

2.3.9. Feromonlar	13
2.3.10. Lipoteikoik asit	13
2.3.11. Cocolysin	13
2.4. Epidemiyoloji	13
2.5. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar	15
2.5.1. Bakteriyemi	16
2.5.2. Üriner sistem enfeksiyonları	17
2.5.3. Endokardit	17
2.5.4. İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar	18
2.5.5. Kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları	18
2.5.6. Santral sinir sistemi enfeksiyonları	19
2.5.7. Solunum sistemi enfeksiyonları	19
2.5.8. Neonatal enfeksiyonlar	19
2.5.9. İmmun sistemi baskılanmış hastalar	19
2.6. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç	20
2.6.1. İntrensek (Doğal) Direnç	21
2.6.1.1. β - Laktam direnci	21
2.6.1.2. Aminoglikozid direnci	22
2.6.1.3. Trimetoprim–Sulfametoksazol direnci	22
2.6.1.4. Linkozamid direnci	23
2.6.2. Kazanılmış Direnç	23
2.6.2.1. Kloramfenikol, Eritromisin ve Klindamisin direnci	23
2.6.2.2. Aminoglikozid direnci	24
2.6.2.3. β - Laktam direnci	25
2.7. Glikopeptit antibiyotikler	26
2.7.1. Vankomisin	26
2.7.2. Teikoplanin	28
2.8. Glikopeptid Direnci	28
2.8.1. <i>Van A</i> tipi direnç	30
2.8.2. <i>Van B</i> tipi direnç	31
2.8.3. <i>Van C</i> tipi direnç	32
2.8.4. <i>Van D</i> tipi direnç	33

2.8.5. <i>Van E</i> tipi direnç	33
2.8.6. <i>Van G</i> tipi direnç	33
2.8.7. Vankomisine bağımlı enterokoklar (VDE)	33
2.9. Enterokoklar Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri	34
2.10. VRE Risk Faktörleri	38
2.11. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi	40
2.12. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri	43
2.12.1. Fenotipik tiplendirme yöntemleri	44
2.12.1.1. Biyotiplendirme	44
2.12.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Protein fingerprinting	45
2.12.1.3. Multi-Lokus Enzim Elektroforezi (MLEE)	45
2.12.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri	46
2.12.1.5. Serotiplendirme	47
2.12.2. Genotipik tiplendirme yöntemleri	47
2.12.2.1. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) Bazlı Yöntemler	48
2.12.2.2. Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı (NAAB) Teknikler	49
2.12.2.3. Dizi analizi yöntemleri	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Örneklerin Toplanması	54
3.2. Bakterilerin Tanımlanması	55
3.2.1. Konvansiyonel Yöntemler	55
3.2.1.1. Katalaz testi	55
3.2.1.2. Safra eskulin testi	55
3.2.1.3. % 6.5'lik NaCl'de üreme testi	56
3.2.1.4. PYR testi	56
3.2.2. Otomatize identifikasyon yöntemi	56
3.3. Duyarlılık Testleri	57
3.3.1. Disk difüzyon testi	57
3.3.2. E Test yöntemi (AB Biodisk)	57
3.4. Kökenlerin Genotiplenmesi için Moleküler Yöntem	58

3.4.1.DNA ekstraksiyonu için yapılan aşamalar	58
3.4.2. Thermalcyclers’da diversiLab parmak-izi kiti kullanarak rep-PCR yapılması aşaması	59
3.4.3.Bioanalizör kullanılarak otomatik mikrofluidic elektroforez yapımı	61
3.4.4. ‘rep-PCR DNA fingerprinting’	62
4. BULGULAR	63
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇLAR	91
7. KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	111

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devleti
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BHI	Brain-Heart İnfüzyon
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CNA	Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar
ddl	D-alanin/ D-ligaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
HAYBÜ	Hemodiyaliz Ara Yoğun Bakım Ünitesi
HICPAC	Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLEE	Multilokus Enzim Elektroforezi
MLST	Multilokus Sequence Tipleme
MRSA	Metisilin Rezistan <i>S. Aureus</i>
MRSE	Metisilin Rezistan <i>S. Epidermidis</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NNIS	National Nosocomial Infection Surveillance System
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEA	feniletıl alkol agar
PFGE	Pulsed Field Gel Electroforez
PYR	L-pyronidonyl-betanaphthylamide

RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
REA	Restriksiyon Enzim Analizi
rep- PCR	Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Based Metod
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
VRE	Vankomisin Rezistan Enterokok
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi

RESİM VE ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Enterokoklar	4
Şekil 2. VRE'nin izole edildiği rektal sürüntü örneklerinin ve çevre örneklerindeki ilişkisini gösteren dendogram	66
Şekil 3. VRE'nin izole edildiği rektal sürüntü örneklerinin ve çevre örneklerindeki ilişkisini gösteren benzerlik matrisi	67
Şekil 4. VRE'nin izole edildiği rektal sürüntü örneklerinin ve çevre örneklerindeki ilişkisini gösteren noktalama grafiği	68
Şekil 5. VRE'nin izole edildiği tarih-klinik-tür ilişkisini gösteren dendogram	70
Şekil 6. VRE'nin izole edildiği tarih-klinik-tür ilişkisini gösteren benzerlik matrisi	71
Şekil 7. VRE'nin izole edildiği tarih-klinik-tür ilişkisini gösteren noktalama grafiği	72
Şekil 8. VRE'nin izole edildiği yatış günü-çevre örneği-klinik ilişkisini gösteren dendogram	74
Şekil 9. VRE'nin izole edildiği yatış günü-çevre örneği-klinik ilişkisini gösteren benzerlik matrisi	75
Şekil 10. VRE'nin izole edildiği yatış günü-çevre örneği-klinik ilişkisini gösteren noktalama grafiği	76
Şekil 11. VRE'nin izole edildiği çevre örneği-yatış günü-fistül ilişkisini gösteren dendogram	78

Şekil 12. VRE'nin izole edildiği çevre örneği-yatış günü-fistül ilişkisini gösteren benzerlik matrisi 79

Şekil 13. VRE'nin izole edildiği çevre örneği-yatış günü-fistül ilişkisini gösteren noktalama grafiği 80

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Streptokok ve enterokok türlerinde belli başlı fenotipik özellikler	4
Tablo 2. Fakültatif anaerobik, katalaz negatif, Gram pozitif kokların fenotipik özellikleri	7
Tablo 3. Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması	8
Tablo 4: Enterokoklarda antimikrobiyal direnç	21
Tablo 5. Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri	30
Tablo 6. VRE suşlarının izole edildikleri hastaların yaş dağılımı	63
Tablo 7. Hastaların birimlere göre dağılımı	64
Tablo 8. Çevre örneklerinden izole edilen VRE suşlarının dağılımı	64
Tablo 9. VRE'lerin tür tayinine göre dağılımı	65

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HEMODİYALİZ ARA YOĞUN BAKIM ÜNİTESİ VE NEFROLOJİ SERVİSİ HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN VANKOMİSİN REZİSTAN ENTEROKOK SUŞLARININ DİRENÇ GENLERİNİN SAPTANMASI VE KLONAL KÖKENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ülkü DABAN

Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yasemin ZER

Haziran 2012, 111 sayfa

Enterokoklar, birçok bakteri türünde var olan virülans faktörlerine sahip olmamalarına rağmen, çevre şartlarına dayanıklı, çeşitli antibiyotiklere intrensek dirençli ve yeni direnç geliştirme yeteneklerinden dolayı, son on yılda hastane enfeksiyonlarının önemli nedenleri arasındadır. Bu amaçla rektal sürüntü kültürlerinin yapılması önerilmektedir. Bu çalışma Eylül 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında hastanemiz Hemodiyaliz Ara Yoğun Bakım Ünitesi (HAYBÜ) ve nefroloji servisinde kronik böbrek yetmezliği tanısıyla yatmakta olan 100 hastanın rektal sürüntülerinden izole edilen enterokok suşları ile çeşitli cansız ortamlardan izole edilen suşların karşılaştırılması ve bakterinin bulaşında çevresel alanların kaynak olup olmayacağını araştırılması amacıyla yapıldı. İzole edilen vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşları ile çalışıldı. Tür ve cins düzeyinde tanımlama konvansiyonel yöntemler ve Vitek 2 (bioMerieux, Fransa) ile yapıldı. Disk difüzyon yöntemiyle vankomisin duyarlılığı araştırıldı. Dirençli suşların E test ile MİK değerleri belirlendi. Genotiplendirme rep-PCR yöntemiyle, DiversiLab (bioMerieux, Fransa) cihazında yapıldı. Örnek toplama süresi içerisinde 100 hastanın rektal sürüntü örneğinden 28'inde, 900 çevre örneğinden 6'sında olmak üzere toplam 34 VRE suşu izole edildi. VRE olarak izole edilen suşların 29'u (% 85) *E. faecium* ve 5'i (% 15) *E. gallinarum* olarak saptandı. Çalışma vankomisin dirençli enterokoklarla yapılmak üzere planlanmışken, 5 örnekte orta duyarlılıkta *E. gallinarum* suşu izole edildi ve onlar da çalışmaya alındı. DNA parmak izi analizinde, çevreden izole edilen suşlarla hasta örneklerinden izole edilen suşlar arasında bir örnekte benzerliğe rastlandı. Hastalardan alınan örneklerde saptanan 28 VRE suşunun ise 5'inin identik olduğu görüldü. Çevresel kaynaklardan çok, hastadan hastaya bulaşın daha sık olması, dezenfeksiyon önlemlerinin hastanemizde iyi uygulandığını, bununla beraber izolasyon önlemlerinin uygulanmasında aksaklık olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: genotiplendirme, rep-PCR, Vankomisine Rezistan *Enterococcus*

ABSTRACT

M.S. Thesis

SEARCHING CLONAL ORIGIN AND IDENTIFICATION OF RESISTANT GENES OF VANCOMYCIN RESISTANT *ENTEROCOCCUS* STRAINS WHICH WERE ISOLATED FROM PATIENTS FROM THE DEPARTMENT OF NEPHROLOGY SERVICE AND HIGH DEPENDENCY HAEMODIALYSIS UNIT

Ülkü DABAN

University of Gaziantep, Graduate School of Health Sciences
Department of Microbiology

Supervisor: Doç. Dr. Yasemin ZER

June 2012, 111 page

Although enterococci have not virulence factors, which many types of bacteria have, they are resistant to environment conditions, intrinsically resistant to various antibiotics, and also capable of acquiring new mechanisms of resistance. Thus, these bacteria have become one of the most important causes of hospital infections during the last decade. Rectal swab cultures are recommended for this purpose. This study aimed to compare the enterococci strains obtained from the rectal swab of 100 patients with chronic renal failure in the our high dependency haemodialysis unit and the department of nephrology service between September 2010 and September 2011 to enterococci strains obtained from various inanimate environment and to investigate whether environmental conditions would be a source of spreading out of the bacteria. The isolated vancomycine resistant *Enterococcus* (VRE) strains were studied. Species and class level were defined by conventional methods and Vitek 2 (bioMerieux, France). Vancomycine susceptibility was explored by disk diffusion method. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of resistant strains was determined by E test. Genotyping was performed by DiversiLab (bioMerieux, France) device with rep-PCR method. During the collecting of samples, totally 34 VRE strains were isolated, twenty-eight of them from the rectal swap of 100 patients and 6 of them from 900 environmental samples. Twenty-nine of these isolated VRE strains were found to be as *E. faecium* (85 %), remain was identified as *E. gallinarum* (15 %). While the study aimed to include vancomycine resistant enterococci, moderately susceptible *E. gallinarum* strains were isolated in 5 samples and they were also included the study. DNA fingerprint analysis revealed a similarity between the strains isolated from environmental sources and a sample which was isolated from patients. It showed that 5 of 28 VRE strains isolated from the patients were also identical. It was concluded that transmission from patient to patient was more frequent than that of environment sources, and disinfection measures in our hospital were implemented properly, however, there was some defects with regard to implementation of isolation measures.

Key words: genotyping, rep-PCR, vancomycine resistant *Enterococcus*

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Enfeksiyon hastalıkları insanlığın varoluşundan bu yana bütün toplumları etkileyen en önemli problemlerden biri olmuştur. Enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmalara karşı eski çağlardan beri çok çeşitli organik ve inorganik kimyasallar, tütümler ve boyalar kullanılmıştır. Penisilini keşfinden sonra antibiyotik çağı başlamış ve takip eden yıllarda çok sayıda doğal, semisentetik ve sentetik antimikrobiyal özelliğe sahip ajan üretilerek enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır. Bu antimikrobiyallerle enfeksiyon hastalıklarının çoğu tedavi edilebilmişken; antibiyotiklerin hatalı kullanımı sonucu yeni bulunan her antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç gelişmiş ve 1900'lü yılların son çeyreğinde *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve enterokoklar gibi hastane florasına hakim olan ve hastane enfeksiyonlarından sık izole edilen bu major patojenlerin klinik izolatları arasında düşük oranda çoklu ilaç direnci gösteren suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır (1-3).

Antibiyotiklerin tedavi amacıyla kullanımından kısa bir süre sonra ortaya çıkan direnç sorununun, bugün ulaştığı boyut endişe vericidir. Tıptaki ilerlemeler, kuşkusuz insan yaşamını uzatmış; ancak bunun yanında, önceleri pek de önemli sanılmayan birçok bakterinin ciddi enfeksiyonlar oluşturmaya olanak sağlamıştır. Yüksek oranda antibiyotik direnci olan bakteriler daha çok hastane ortamında bulunmakta, ancak toplum kaynaklı olarak da saptanabilmektedir. Bunlardan barsak kolonizasyonu sık olan enterokoklar, son yıllarda özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda etken olarak daha fazla önem kazanmışlardır (4).

Günümüzde “enterokoklar” olarak adlandırılan grup eskiden “fokal orijinli streptokoklar” olarak gruplandırılmıştır. Lancefield tarafından 1930'larda yapılan sınıflandırmada enterokoklar, D grubu streptokoklar arasında yer almış, Sherman ilk kez 1937 ve 1938 yılında enterokok grubu bakterileri tanımlamıştır (5).

1984 yılında da DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon deneyleri sonucunda, *S. faecalis* ve *S. faecium*'un streptokoklardan ayrılarak *Enterococcus* cinsine aktarılmasını

önermişlerdir. Bu cins içindeki bakterilere daha sonra diğer enterokok türleri eklenmiştir (6).

Enterokok türleri doğada toprak, su ve yiyeceklerde, çeşitli hayvanların ve insanların florasında yer alabilir. İnsanlarda en çok gastrointestinal ve genitoüriner florada bulunur. Gastrointestinal florada (en fazla kolonda) varlığı tespit edilen enterokoklar arasında *E. faecalis*'in, *E. faecium*'a göre birkaç kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (7).

Gram-pozitif koklardan oluşan enterokok türleri, çevre koşullarına dayanıklı olmaları, sefalosporinler, sülfometoksazol, makrolidler gibi bazı antibiyotiklere doğal direnç göstermeleri, penisilinlere azalmış duyarlılıkları ve ortamda yaygın olarak bulunmaları nedeniyle yıllar içerisinde klinik önem kazanmış, çok çeşitli enfeksiyonlara yol açabilen bakterilerdir. Glikopeptid antibiyotiklere direnç kazanmaları ile birlikte tüm dünyada önemleri daha da artmıştır. (8)

Önceleri hastanede yatan olgulardan izole edilen, enterokokların tamamının endojen barsak florasından kaynaklandığı düşünülmekteydi. Fakat çoklu ilaç direnci gösteren enterokokların artışı sonucu yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu mikroorganizmaların hastane ortamında yayıldığını göstermiştir (9, 10). Bu bakterilerin barsak florasında bulunması hastanede yayılımında temel risk faktörüdür (11).

Bu çalışmanın amacı, Hemodiyaliz Ara Yoğun Bakım Ünitesi (HAYBÜ) ve nefroloji servisinde kronik böbrek yetmezliği tanısıyla yatmakta olan hastalardan izole edilecek VRE suşları ile çeşitli ortamlardan izole edilecek suşların genotipik olarak karşılaştırılması ve bulaşta muhtemel rezervuar olabilecek yerlerin saptanmasıdır. Her iki örnek türünde de genotipik olarak benzer suşların bulunması durumunda, enfeksiyon kontrol önlemlerinde çeşitli yönlendirme yapılabilecek, iki birim arasında hasta transferinde gerekli önlemler alınabilecek ve VRE yayılımı için önlem alınabilecektir. Böylece pozitif hastaların daha erken izole edilmesi, ortamın ne oranda ve hangi alanların enfekte olduğunu, gerektiği durumlarda ortam temizliği ve izolasyonun daha etkin yapılması hedeflendi. Erken tanı konulması ile alınacak tedbirler sayesinde hastanede diğer hastalara bulaş, olası bir salgının önlenmesi ve hastane maliyetinin düşürülebilmesi için bu çalışma planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi ve Sınıflandırma

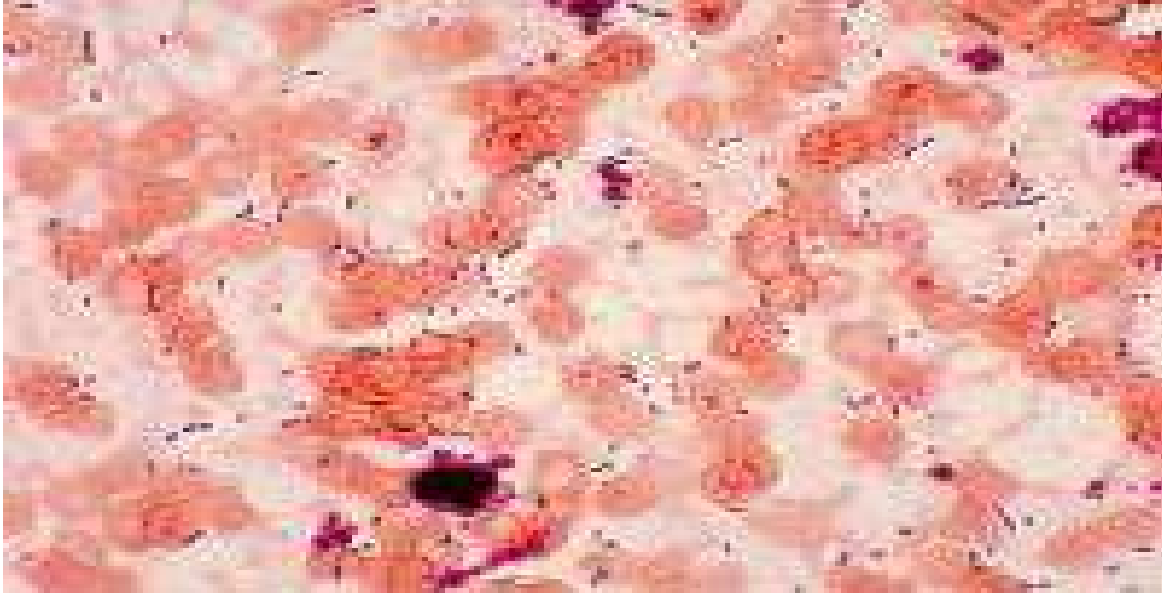
Günümüzden 100 yıl önce, Andrews ve Holder dışkıdan izole ettikleri, mannitol ve laktozu asit oluşturarak fermente eden, rafinozu kullanmayan Gram pozitif koklara *Streptococcus faecalis* adını vermişlerdir. 1940'lı yıllarda karbonhidrat fermantasyon reaksiyonları farklı ikinci bir fekal bakteri cinsi tanımlanmış ve *Streptococcus faecium* olarak adlandırılmıştır (7). Enterokoklar 1984 yılına kadar Lancefield sınıflamasında D grubu streptokoklara dahil edilmiş bu yıldan sonra Kilpper-Balz tarafından yapılan genetik çalışmalar sonucunda *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* suşlarının bu genusun diğer yerlerinden ayrı bir genus olarak ele alınması gerektiği anlaşılmıştır. O zamandan beri, bu genusa *Enterococcus* denilmektedir (12, 13).

2.2. Enterokokların Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterokoklar sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sisteminde, ayrıca böceklerde, bitkilerde dışkı ile kirlenmiş toprak, su ve yiyeceklerde de bulunur. Bu sebeple içme ve kullanma sularındaki fekal kontaminasyonun gösterilmesi için indikatör mikroorganizma olarak kullanılırlar. İnsan dışkısında *E. faecalis* (10^5 - 10^7 CFU/gr), *E. faecium*'dan (10^4 - 10^5 CFU/gr) daha yaygın bulunur, fakat özellikle hastane ortamında *E. faecium* daha baskındır (14).

Enterokoklar Gram pozitif tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde görülebilen koklardır (15) (Şekil 1). Agar plaklarındaki üremelerde bakteriler kokobasil morfolojisinde görülebilir. Tiyogliolatlı buyyonda kısa zincirler halinde ovoid görünümündedir. Mikroskopik olarak streptokok türlerinden ayrılmazlar (enterokok ve streptokok türlerinin kıyaslamalı fenotipik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir). Enterokoklar fakültatif anaerob bakterilerdir. *E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı kökenler hareketlidir. Enterokokların sitokrom enzimleri olmadığından katalaz

negatiftirler. Fakat bazı suşları (özellikle *E. faecalis*) ilk izolasyon sırasında görülüp seri pasajlarda kaybolan psödokatalaz üretir ve katalaz testinde zayıf bir pozitiflik görülebilir (12, 14, 16).



Şekil 1: Enterokoklar(15)

Tablo 1: Streptokok ve enterokok türlerinde belli başlı fenotipik özellikler (12).

Bakteri	Hemoliz	Basitrasin	TMP-SMZ	CAMP	Hippurat hidrolizi	PYR	Safra eskülin	NaCl	Optokine	Safra duyarlılık
Grup A	β	S	R	-	-	+	-	-	R	-
Grup B	β, γ	R	R	+	+	-	-	D	R	-
Grup CFG	β, α	D	S	-	-	-	-	-	R	-
Grup D-nonenterokok	α, γ	R	S	-	-	-	+	-	R	-
Grup D enterokok	α, β, γ	R	R	-	D	+	+	+	R	-
Viridans streptokok	α, γ	D	S	-	D	-	D	-	R	-
<i>S. pneumoniae</i>	α	D	S	-	-	-	-	-	S	+

S: Duyarlı, R: Dirençli, D: Değişken, TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol.

İdeal üreme ısı 35 °C olmakla birlikte 10-45 °C arasında değişen bir üreme aralığına sahiptir. % 6.5 NaCl'de ürerler. % 40 safra varlığında eskülünü hidrolize ederler (safra-eskülünlü besiyeri ile bu özellik gözlemlenebilir). Tüm *Streptococcus bovis* türlerinin ve viridans streptokokların % 10'unun safra-eskülünü hidrolizi pozitifdir. *E. cecorum*, *E. columbae* ve *E. saccharolyticus* dışında tüm enterokoklar, PYR (L-pyridonidonyl-betanaphthylamide) pozitifdir (17). Tüm suşlar lösinaminopeptidaz (LAP) oluştururlar (12, 14, 16). Glikozdan gaz oluşturmazlar ve glikoz fermentasyonunun son ürünü laktik asittir. 60 °C'ye 30 dakika dayanıklıdır. Kanlı agarda 0.5 -1.5 mm boyutunda, (streptokoklardan daha büyük) kabarık, gri-beyaz renkte koloniler yaparlar. Bazen zayıf bir alfa hemoliz meydana getirebilirlerse de genellikle nonhemolitiklerdir (7, 12, 16). *E. faecalis* ve *E. durans* suşları kanlı agarda beta-hemoliz yapabilirler. *E. faecalis*'in bazı suşları at veya tavşan kanı içeren besiyerlerinde beta hemoliz yapmalarına rağmen, koyun kanı içeren besiyerlerinde hemoliz yapmazlar (12, 14, 16).

Enterokokların laboratuvar ortamında üretilmesi ve yaşatılması kolaydır. Çoğu 60 °C'de 30 dakika ısıtılmaya dayanıklıdır. Buzdolabında aylarca, -70 °C'de yıllarca saklanabilir, fakat donma ve sonra yeniden eritme işlemleri ömürlerini kısaltır. Normal etüv ortamında, her türlü besiyerinde kolayca ürer. Trypticase-soy-%5 koyun kanlı agar, brain-heart infüzyon-%5 koyun kanlı agar ya da herhangi bir kanlı besiyeri üremesini destekleyicidir. İzolasyonlarında seçici besiyerleri kullanılabilir. Azid içeren besiyerleri seçici izolasyonda başarılıdır. Azid, Gram negatif bakterileri inhibe eder, besiyerindeki eskülünü hidrolize ederek siyah koloniler oluşmasına neden olur (eskülünlü safralı azidli agar, coccose agar) (17).

Gram negatif bakterileri de içeren karışık örneklerden soyutlanmaları için, selektif besiyeri olarak, azid içeren safra-eskülün-azid veya Enterococcosel agar, Columbia-Kolistin-Nalidiksik asit agar (CNA) veya feniletıl alkol agar (PEA) kullanılabilir. CNA, PEA'ya göre bakterinin hemoliz özelliğini değerlendirmede daha değerlidir. Kontamine alanlardan özellikle *E. faecium* izolasyonu için de sefaleksın-aztreonam-arabinoz agar kullanılabilir. Vankomisin dirençli enterokok saptanması için 6 µg/ml vankomisin ilave edilmiş brain-heart infüzyon (BHI) agar veya enterococcosel sıvı besiyeri kullanılabilir (17).

Enterokokların hücre duvar yapısı diğer Gram pozitif koklara benzer. Peptidoglikan, teikoik asit, lipoproteinler ve yüzey protein antijenlerinden oluşur. Lancefield'in grup D antijeni, hücre duvarı ile bağlantılı bir gliserol olan teikoik asitten oluşur. Enterokoklar

D grubu antiserumlarla % 80 oranında aglütinasyon verirler. Bu sonucu, ekstraksiyon işlemi ve antiserum kalitesi etkileyebilir. Grup D antijeni tespiti, enterokoklar dışında, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. suis*, *Pediococcus* spp. ve *Leuconostoc* spp. gibi diğer Gram pozitif bakterilerde de bulunabildiğinden, özellikle doğal olarak glikopeptid direnci bulunan *Leuconostoc* spp. ve *Pediococcus* spp.'den ayırımı için PYR hidrolizinden yararlanır.

Klinik laboratuvarlardan izole edilen suşların % 80-90 *E. faecalis*'tir. *E. faecium* ise izolatların % 5-10 kadarını oluşturur. Son zamanlarda özellikle çoğul dirençli suşlarının hastanelerde arttığı saptanmıştır. Nadir olarak da diğer enterokok suşları (*E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. flavescens*, *E. avium* ve *E. hirtae*) klinik izolatlardan izole edilirken, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium* ve *E. sulfureus* ise izole edilmemiştir. PYR testi negatif olan ve atipik enterokoklar olarak adlandırılan *E. columbae*, *E. cecorum* ve *E. saccharolyticus* da insanlardan izole edilmemiştir (17-19).

Enterokokların tiplendirilmesi için çeşitli moleküler teknikler kullanılmaktadır. Ayrıca bakteriosin tiplendirmesi, faj tiplendirmesi, biyokimyasal reaksiyon profilleri, antimikrobiyal direnç paternleri ve serolojik yöntemlerde kullanılabilir (Tablo 2)(20). *E. flavescens*, *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* gibi bazı kökenler hareketlidir. *E. faecalis*, *E. faecium*'un tersine %0.04 tellürit içeren ortamda ve agarda siyah koloniler yaparlar. Bu özellikleri enterokokları tanımlamada yeterli ise de daha az rastlanan *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri gibi Gram pozitif, katalaz negatif koklarda da benzer özellikler bulunur. Bu türlerle enterokokların ayırımı Tablo 2' de verilmiştir. *Lactococcus* ve *Aerococcus* türleri grup D antiserumu ile reaksiyon vermemeleri, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* türleri de PYR negatif olmaları ile enterokoklardan ayrılırlar (20, 21).

Tablo 2. Fakültatif anaerobik, katalaz negatif, Gram pozitif kokların fenotipik özellikleri

Test	VAN	GAZ	PYR	LAP	%6.5 NaCl	10°C'de	Üreme	45°C'de	Üreme	Safra-Eskülin	Moti-lite	Hemoliz
<i>Vagococcus</i>	S	-	+	+	+	+	V	+	+	+	+	α,n
<i>Enterococcus</i>	S	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V	α, β, n
<i>Streptococcus</i>	S	-	-b	+	-d	-	V	-c	-	-	-	α, β, n
<i>Lactococcus</i>	S	-	+	+	V	+	V	+	-	-	-	α, n
<i>Abiotrophia*</i>	S	-	+	+	+	V	-	-	-	-	-	α
<i>Leuconostoc</i>	R	+	-	-	V	+	V	V	V	-	-	α, n
<i>Pediococcus</i>	R	-	-	+	V	-	+	V	-	-	-	A
<i>Globicatella</i>	S	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	A

*Daha önceden beslenme yönünden eksik (nutritionally-deficient) streptokoklar olarak bilinen mikroorganizmalar. VAN: Vankomisin duyarlılığı, GAZ: Glikozdan gaz oluşumu, LAP: Leucine aminopeptidase yapımı, PYR: L-pyrrolidonyl-Bnaphth1ylamide, +:>%95 pozitif reaksiyon, -:<%5 pozitif reaksiyon, a: vankomisin dirençli suşlar hariç, bazı suşlar dirençli olduğu halde disk çevresinde küçük bir zon oluşturabilir. b: *S. pyogenes*, *S. iniae* ve *S. porcinus* PYR pozitif, diğerleri negatiftir. c: viridans streptokokların %5-10'u safra-eskülin pozitifdir. d: bazı beta-hemolitik streptokoklar %6,5 NaCl'de ürerler. v: değişken.

Enterokoklar mannitol, sorbitol, sorboz içeren sıvı besiyerlerinde asit oluşturmalarına ve arginini hidrolize etmelerine göre beş gruba ayrılırlar (Tablo 3) (22).

Grup 1: *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. pallens*, *E. gilvus*'dan oluşur. Bu türler mannitol, sorbitol ve sorboz sıvı besiyerinde asit oluşturur, ancak arginini hidrolize etmezler.

Grup 2: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. haemoperoxidus*, *E. mundtii* ve *E. gallinarum*'dan oluşur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize ederler, mannitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

Grup 3: *E. villorum*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. ratti* ve *E. faecalis* ile *E. faecium*'un mannitol negatif varyantları bu grubu oluşturur. Bu gruptaki türler D

antijeni içermez, arginini hidrolize ederler, fakat mannitol, sorboz ve sorbitol içeren sıvı besiyerlerinin hiçbirisinde asit oluşturmazlar.

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

Grup 5: *E. columbae*, *E. canis*, *E. moraviensis* bu grupta bulunur. Bu gruptaki türler arginini hidrolize etmezler, monnitollü sıvı besiyerinde asit oluştururlar, sorbozdan asit oluşturmazlar ve sorbitollü sıvı besiyerinde değişken reaksiyon verirler.

Tablo 3. Fenotipik özelliklerine göre enterokok türlerinin sınıflaması

Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
<i>E. palens</i>	<i>E. casseliflavus</i> ***	<i>E. villorum</i>	<i>E. sulfurens</i>	<i>E. faecalis</i> *
<i>E. malodoratus</i>	<i>E. faecium</i> *	<i>E. faecalis</i> *	<i>E. phoeniculicola</i>	<i>E. moraviensis</i>
<i>E. raffinosus</i>	<i>E. gallinarum</i> ***	<i>E. ratti</i>	<i>E. asini</i>	<i>E. columbae</i>
<i>E. pseudoavium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. cecorum</i>	<i>E. canis</i>
<i>E. gilvus</i>	<i>E. faecalis</i> *	<i>E. faecium</i> *		<i>E. casseliflavus</i> *
<i>E. avium</i>	<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. dispar</i>		<i>E. gallinarum</i> ***
<i>E. saccharolyticus</i>		<i>E. hiraе</i>		

*, **, *** Aynı türler farklı özelliklerine göre farklı gruplara dahil edilmiştir.

2.2.1. Bazı enterokok türlerinin özellikleri

***E. faecalis*:** Gastrointestinal flora üyesidir. Ağız, hepatobiliyer sistem ve vajinadan da izole edilmiştir. İnsan kaynaklı enfeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan türdür. Ayrıca çeşitli hayvanlarda da bulunur. Üriner enfeksiyon, yara, periton sıvısı, derin pelvik apse, endokardit ve kan kültürlerinden izole edilmiştir. Genellikle beta hemolitikdir. %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer.

***E. faecium*:** İnsan ve sığırların gastrointestinal sisteminde bulunur. Yiyecek, sebze ve yemlerden de izole edilmiştir. İki biyotipi vardır. *E. faecalis*'e göre antimikrobiyalere daha rezistandır. Alfa hemolitikdir. %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer.

E. durans: Süt ve kuru gıdadan izole edilmiştir. İnsan ve hayvanda nadiren, barsak ve üriner sistemden izole edilmiştir. Alfa hemolitiklidir. %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer. 50 °C'de üremez.

E. avium: Kuşlar, tavuk, köpek gibi hayvanlardan izole edilmiştir. İnsan gastrointestinal sistem florasının da bir parçasıdır. Apandisit, otit ve beyin apselerinden izole edilmiştir. Alfa hemolitiklidir. %6.5'lik NaCl'de üremesi zayıftır. H₂S üretir, pigment yapmaz.

E. casseliflavus: Bitki ve toprakta bulunur. Vankomisine dirençlidir. Fırsatçı insan enfeksiyonları yapar. %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer. Hareketlidir, sarı pigment yapar.

E. gallinarum: Evcil kuşların gastrointestinal sisteminde bulunur. İnsanda hemodiyalizli bir hastadan izole edilmiştir. Vankomisine dirençlidir. Koyun kanlı agarda nonhemolitiklidir. At kanlı agarda beta hemoliz yapabilir. %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer. Hareketlidir, pigment yapmaz.

E. hirae: Domuz ve tavuklarda bulunur. Önceden atipik *E. faecium* sanılırdı. Hemoliz yapmaz. 10-45 °C arasında üreyebilir. %6.5'lik NaCl ve pH 9.6'da ürer (23-26).

2.2.2. Enterokok tanımlamasında kullanılan testler

Hastalardan alınan klinik örnekler; tercihen Columbia koyun kanlı besiyerlerine ekilir. Bu bakteriler 45°C sıcaklıkta üreme özelliğine sahiptir. Etüvde 35°C'de 24–48 saat inkübe edilir. Ertesi gün üreyen koloniler Gram boyanır. Gram pozitif kok olanlara aşağıdaki işlemler uygulanarak enterokok tanımlaması yapılır (27).

2.2.2.1. Katalaz testi

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalayarak su ve oksijene dönüştürür. Enterokoklar katalaz enzimi içermediği için hidrojen peroksiti parçalayamaz. Katalaz testinden test edilecek koloni lama konularak üzerine %3'lük hidrojen peroksitten damlatılır. Kabarcıklar oluşmaması katalaz negatif reaksiyon olarak değerlendirilir (27).

2.2.2.2. Safra-eskülin testi

Enterokoklar %40 sığır safrası içeren besiyerinde üreyebilme ve eskülini hidrolize edebilme özelliğine sahiptir. Bu test enterokokları diğer katalaz negatif, Gram pozitif

koklardan ayırmada kullanılır. Yüzde kırk sığır safrası ve %0.1 gram eskulin içeren bile esculin besiyerine enterokok olduğu düşünülen koloniler ekilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilir. İçerisindeki demir sitrat ayıracı, eskulinin hidrolizasyonu ile siyah renk oluşturur. Bu koloniler enterokok açısından değerlendirilmek üzere işleme alınır (27).

2.2.2.3. % 6.5' lik NaCl üreme testi

Enterokoklar % 6.5 NaCl içeren ortamlarda üreyebilir. Beyin infüzyon agarına % 6.5 NaCl ilave edilerek hazırlanan besiyerine şüpheli koloni ekilir ve 37°C'de 24–48 saat inkübe edilir. Besiyerinde üreme pozitif sonuç olarak değerlendirilir (27).

2.2.2.4. PYR (pirolidonil-β-naftilamid) testi

PYR testi PYR'az (pirolidonil-β-naftilamid) enziminin aktivitesini tespit etmek için hazırlanmış kolorimetrik bir testtir. PYR testi ticareten hazır olarak temin edilir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerekli işlemler yapıldıktan sonra menekşe renk pozitif olarak değerlendirilir (27).

2.2.2.5. Hareket testi

Bazı enterokok türlerinin hareketli olup olmadığını test etmek için kullanılır. Test edilecek mikroorganizma iğne özeye alınarak hareket besiyerinin sonuna kadar çizgi şeklinde inoküle edilir. 37°C de 24–48 saat inkübe edilip, günlük olarak inokülasyon çizgisi etrafındaki bakteriyel üreme alanları gözlenir. İnokülasyon çizgisi etrafında dallanan üreme olması durumunda hareket testi pozitif olarak yorumlanır (27).

2.3. Virulans Faktörleri

Genel olarak enterokoklar, *S. aureus*, *S. pyogenes* gibi mikroorganizmalar kadar intrinsik virulansa sahip değildir. Orofarinkste kolonize olmalarına rağmen nadiren alt solunum yolu enfeksiyonlarına yol açarlar. Klasik bir virulans faktörü olmamasına rağmen enterokokların çok sayıda antimikrobiyal ajana dirençli olması, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan hastalarda yaşamalarına ve çoğalmalarına imkan

tanıyarak süperenfeksiyonlara yol açmaktadır (28). Çalışmalarda enterokokal bakteriyemilerde %42-68 oranında mortalite bildirilse de bu hastaların ileri derecede düşükün olması ve çoğunda polimikrobiyal bakteriyemi bulunması nedeniyle, enterokokların mortalitedeki rolleri tam olarak tespit edilememektedir (29). Bazı çalışmalarda da enterokokların mortalitedeki rolleri %31-37 oranında saptanmıştır (30, 31).

2.3.1. Sitolizin

Salgınlardan izole edilen *E. faecalis* suşlarında %60'a varan sıklıkta saptanabilen bir virulans faktörüdür. Hemolitik özellik taşımaktadır. Sitolizin kodlayan gen bölgesi plazmid üzerinde ya da bakteriyel kromozoma entegre olarak bulunabilmektedir. Toksik aktivitesi ile birlikte, çok sayıda Gram pozitif bakteriyi etkileyebilen bakteriyosin olarak da işlev gördüğü gösterilmiştir. Toksin insan ile at kanlı agarlarda hemolitik aktiviteye sahipken, koyun eritrositlerinde etkili olmayışı klinik laboratuvarlarda tanısal açıdan önemli bir özelliktir (7). İnsanlarda patojen olan enterokok suşları arasında, sitolizin üretenlerin oranının, non patojen olduğu düşünülen suşlardan fazla olduğu gösterilmiştir (32).

2.3.2. Agregasyon faktörü

Birçok özelliği ile bakterinin virulansına katkıda bulunmaktadır. Bir yüzey proteini. Etkin alıcı ve verici hücre birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aynı zamanda bakterilerin agregasyonunu da sağlayarak virulansa katkıda bulunmaktadır. Agregasyon faktörü, enterokoklara kalp kapakları ve böbrek epitel hücrelerine bağlanma ve endokardit ve üriner sistem enfeksiyonu oluşturma yeteneğini sağlamaktadır. Özellikle katater enfeksiyonlarında, *E. faecalis* izolasyonu *E. faecium*'a göre daha fazladır. *E. faecalis* suşlarına katetere tutunma yeteneğini agregasyon faktörü sağlamaktadır (7).

2.3.3. Jelatinaz

Jelatinaz enzimi olan ve olmayan izojenik *E. faecalis* suşları ile yapılan çalışmalarda, jelatinaz üreten suşların akut toksik etkilerinin üretmeyen suşlara kıyasla yüksek olduğu gösterilmiştir (7).

2.3.4. Ekstraselüler süperoksit

E. faecalis suşlarının büyük çoğunluğu ve bazı *E. faecium* türleri tarafından sentezlenmektedir. Süperoksit üretiminin bakterinin yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (7).

2.3.5. Ekstraselüler yüzey proteini

İlk kez *E. faecalis* türlerinde tanımlanan bu büyük yüzey proteininin kompleks bir yapılıması bulunmaktadır. Karboksi ucu hücre duvarına tutunmayı sağlarken, proteinin iç kısmında tekrarlayan ünitelerden oluşan ve moleküle uzayıp kısalabilme özelliği kazandıran bölge bulunmaktadır. Bu proteinin bakterinin immun yanıtıdan kaçışını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (7).

2.3.6. Kapsüler polisakkarid antijeni

Enterokok polisakkarid antijeni, hücre duvarı, beta-D glikoz-1 fosfat, teikoik asit ve tetraheteroglikan komponentlerinden oluşur. Opsonik antikor için hedef olduğundan dolayı, enterokok virulansının yanısıra enfeksiyona karşı immunitede rolü vardır ve aşı çalışmalarında araştırılmaktadır (7).

2.3.7. Antibiyotik direnci

Nozokomiyal enterokokal enfeksiyonların kabaca iki basamaklı bir yol izlediği söylenebilir. Öncelikle hastanın hastaneye yatışından kısa bir süre sonra intestinal florada bulunan, antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virulans özelliklerine sahip suşlar, antibiyotik kullanımı sonucu duyarlı suşların ortadan

kalkmaları ile birlikte sayıca artmakta ve sonraki aşamada, hastaların bir kısmında gastrointestinal floradan kaynaklanan bu suşlar doku invazyonuna neden olmaktadır. Virulans faktörleri arasında bulunan antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır (7).

2.3.8. Biyofilm

E. faecalis'te görülen biyofilm oluşumu bu bakterinin üriner sisteme, vasküler kataterlere ve kalp kapaklarına kolonize olmasını kolaylaştırır (21).

2.3.9. Feromonlar

Enterokoklar tarafından sentezlenen küçük peptitlerdir. Suşlar arası plazmid DNA'sının konjugasyonunu denetler. Nötrofiller için kemotaktik olduklarından enfeksiyonlarda inflamatuvar cevabı artırır (7).

2.3.10. Lipoteikoik asit

Enterokokların D grubu antijenlerini oluşturur. Tümör nekroz faktör ve interferon salınmasına yol açarak immün cevabın düzenlenmesini sağlar (7).

2.3.11. Cocolysin

Ekstrasellüler metalloendopeptidazdır ve virülansta rol oynadığı düşünülmektedir. *E. faecalis* suşları tarafından üretilmektedir (33).

2.4. Epidemiyoloji

Enterokoklar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin üyeleridir. Doğada; toprak, su, bitki, kuşlar böcekler ve memelilerde yaygın olarak bulunurlar. İnsanlarda, esas olarak gastrointestinal florada bulunmaları nedeni ile gerek hastane gerekse hastane dışı ortamda endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadırlar. *E. faecalis* diğer enterokok türlerine göre dışkıda daha yüksek oranda bulunur (16).

İnsanlarda barsak florasının bir parçası olduğundan enterokoklar toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlar yapabilirler. Geleneksel olarak enterokoklarla meydana gelen enfeksiyonların çoğunda etkenin hastanın kendi florasından kaynaklandığı düşünülür. Buna rağmen pek çok hospitalize hastada veya örneğin periton ya da hemodiyaliz yapılan tedavi altındaki hastalarda da enfeksiyon gelişir. Bu tip enfeksiyonlarda etkenin sıklıkla eksojen kaynaklı olduğu sanılır. Hastadan hastaya bulaşmada kesin bir yol yoktur. Nozokomiyal enfeksiyon yapan enterokoklar bazen hastane personelinin ellerinden ve sıklıkla da hastane içi çevresel kaynaklardan izole edilmiştir (28).

Enterokoklar, çevre koşullarına dayanıklı olduklarından her çeşit ortamda canlılıklarını sürdürebilirler. Hastane ortamında bulunan stetoskop, kapı tokmağı, yatak, komidin gibi cansız maddeler üzerinde uzun süre yasayabilmektedir. Dirençli enterokokların yayılımına elektronik termometreler de yardım edebilir. Bu nedenle enterokoklar, gerek cansız maddeler aracılığı ile, gerekse sağlık personeli ile hastadan hastaya taşınarak hastane enfeksiyonu olarak salgınlarına yol açabilmektedir (34).

ABD ve Avrupa ülkelerinde VRE epidemiyolojisi yönünden bazı farklılıklar bulunmaktadır. Avrupa'da çeşitli hayvan kaynaklarından ve lağımlardan VRE izolasyon sıklığı oldukça yüksektir. Bunun nedeninin bu ülkelerde kullanılan glikopeptid (avoparsin) içeren hayvan yemleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (35, 36). Her iki durumda da intestinal rezervuar en önemli kaynaktır. Vankomisin dirençli enterokok ilk olarak 1986'da Avrupa'da ve 1987'de Amerika'da rapor edilmiştir (37). Avrupa ülkelerinde VRE henüz önemli bir nozokomiyal patojen haline gelmemiştir. Ancak İngiltere'de 1987-1998 yılları arasında VRE sorunu ile karşılaşan merkez sayısı birden 136'ya yükselmiş, 1000 den fazla hasta VRE ile kolonize veya infekte olmuştur. İsveç, Polonya, İtalya, Almanya, Finlandiya ve Hollanda gibi çok sayıda Avrupa ülkesinden nozokomiyal VRE epidemileri bildirilmiştir. ABD örneğinin aksine bu salgınların hepsi kısa süre içinde kontrol altına alınmış ve VRE oranlarının artması önlenmiştir. Toplumdaki VRE rezervuarının hastaneler için bir tehdit oluşturabileceği endişesi ile 1997 yılında Avrupa Birliği ülkelerinde hayvan yemlerine avoparsin eklenmesi yasaklanmıştır (7).

ABD'de bugün için en önemli VRE rezervuarı, hastane de yatan hastaların gastrointestinal sistem kolonizasyonudur. Bu kişiler genellikle asemptomatik olduklarından ancak sürveyans çalışmaları sırasında VRE taşıdıkları saptanabilir (38). Bu nedenle enterokoklar gerek cansız maddeler aracılığı ile, gerekse sağlık personeli ile

hastadan hastaya taşınarak hastane enfeksiyonu olarak salgınlara yol açabilmektedir (34).

1984 yılı Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) verilerine göre, enterokokların hastane enfeksiyonlarında % 10.4 oran ile üçüncü sıklıkta sorumlu olduğu görülmektedir (24). Enterokoklarda beta-laktam antibiyotiklere ve aminoglikozidlere 1980'li yıllarda direncin ortaya çıkması üzerine vankomisin uzun yıllar tek uygun antibiyotik olarak kullanılmıştır. VRE'ler ilk kez 1988 yılında Uttley ve arkadaşları tarafından İngiltere'den, Leclerg ve arkadaşları tarafından da Fransa'dan bildirilmiştir. Bunu diğer Avrupa ülkeleri ve ABD'den bildirilen olgular ve VRE epidemileri izlemiştir. National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS) tarafından yayımlanan rapora göre 1989-1993 yılları arasında nozokomiyal VRE enfeksiyonları %0.3'ten %7.9'a yükselmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde ise bu oran % 0.4'ten 34 kat artarak %13.6'ya ulaşmıştır. İngiltere'de yapılan 1971-1985 yılları arasındaki kan kültür izolatları arasında görülme sıklığı %3 iken, 1986-1995 yılları arasında bu oran %12'ye yükselmiştir. 2000 yılında ise hem yoğun bakım ünitelerinde hem de normal servislerde nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan VRE %25'in üzerine çıkmıştır (24).

Türkiye'de ilk vankomisin dirençli *E. faecium* susu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden Vural ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu suş malign histiyositozis tanısı almış, bronkopulmoner enfeksiyonu olan bir bebekte plevra sıvısından izole edilmiştir. Bunu aynı yıl içerisinde diğer merkezlerden yapılan bildirimler takip etmiştir (39).

2.5. Enterokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Son yıllarda enterokokların neden olduğu enfeksiyonlar oldukça artmış olup, özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler arasında ön sıralarda yer almaktadır (40). Enterokoklar aslında çok virülan değildir. Özellikle hastaneye yatırılan yaşlı, immüsuprese ve ciddi hastalığı olanlarda hastalık oluşturmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonları en sık rapor edilen enfeksiyonlardır (41).

Enterokoklar üriner sistem ve yara enfeksiyonlarının yanı sıra endokardit, salpenjit, endometrit, peritonit, safra yolu enfeksiyonları, karın içi abseleri, bakteremi bazen menenjit gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (17).

Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80-90'ından *E. faecalis*, %5-15'inden ise *E.faecium* sorumludur. *E.gallinarum*, *E.casseliflavus*, *E.avium* ve *E.raffinosis* gibi diğer enterokok türleri klinik örneklerin %5'inden izole edilmiştir (40).

Enterokokların neden olduğu başlıca enfeksiyonlar;

- Bakteriyemi,
- Üriner sistem enfeksiyonları,
- Endokardit,
- İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar,
- Kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları,
- Santral sinir sistemi enfeksiyonları,
- Solunum sistemi enfeksiyonları,
- Neonatal enfeksiyonlar,

Bu enfeksiyonlar içinde en çok problem yaratan enterokok bakteriyemisi (42).

2.5.1. Bakteriyemi

Enterokokların doku faktörünü uyararak fibrin üretimi ve trombosit agregasyonunu arttırması, agregasyon maddesi salgılayarak endotel başta olmak üzere hücrelere bağlanması, zedelenmiş kalp kapakçıklarındaki fibrinonektine direkt adhere olabilmesi ve serotonin salınımını etkileyerek trombosit agregasyonunu arttırması bakteriyemi gelişimine zemin hazırlayan faktörlerdir (43).

Enterokokların üçüncü sıklıkta neden olduğu enfeksiyonlardır. %78'i nozokomiyaldir. Nozokomiyal enterokokal bakteriyemilerin çoğunda infektif endokardit yoktur, ancak hastane dışında gelişen bakteriyemilerin 1/3 inde endokardit vardır. Enterokoklar, pozitif kan kültürlerinin yaklaşık %5'inden izole edilirler (44). Kaynak genellikle gastrointestinal sistemdir (45).

Hastane enfeksiyonları içerisinde giderek artan öneme sahip olan VRE bakteriyemileri, hastane kökenli tüm bakteriyemiler içerisinde Avrupa'da 4. ABD'de ise 3. sıklıkta görülmektedir. VRE bakteriyemisi için risk faktörler, hemodiyaliz, organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, kemoterapi veya parenteral beslenme, cerrahi girişimler, ciddi hastalıklar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, üriner kateterler, nötropeni ve mukozittir. Enfeksiyonlar sıklıkla nozokomiyal kaynaklıdır. Olguların

%21-45'i polimikrobiyal olan bakteriyemiler de primer lokalizasyon sıklıkla üriner sistem veya karın içi enfeksiyonlardır. Ancak, pelvik enfeksiyonlar, termal yanık, dekübitis ülserleri ve diabetik ayak gibi yaralar, arteryel veya venöz kateterler ve kolanjit VRE'nin dolaşıma katılımını sağlayan diğer giriş yollarını oluştururlar (21, 46).

2.5.2. Üriner sistem enfeksiyonları

Enterokokların en sık neden olduğu enfeksiyonlardır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında enterokoklar en sık idrar kültürlerinden izole edilirler. Genellikle nozokomiyal enfeksiyonlara yol açarlar. ABD' de nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları arasında enterokoklar ikinci en sık etkindir (44, 47).

Uzun süreli sonda kullanımı, antibiyotik kullanımı, anatomik yapı anomalisi bulunması üriner enterokok enfeksiyonları ve kolonizasyonu için risk faktörüdür (40). Erkek olmakta, enterokok ve diğer Gram pozitif etkenler ile üriner enfeksiyon için bir risk oluşturmaktadır. Piyelonefrit, komplike olmayan sistit, perinefritik apse veya prostatit etkeni olabilirler. Hastane dışında komplike olmayan sistit olgularının nadir nedenidir. Yapılan bir çalışmada *E. faecalis*'in, *E. faecium*'a oranla kateterlere yapışma oranının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Enterokokal üriner enfeksiyonlarda bakteriyemi gelişmediği sürece mortalite oldukça düşüktür (48).

Bazı enterokok türleri tarafından üretilen agregasyon maddesi renal tübüler hücre kültürlerinde organizmanın adhezyonunu sağlar. Bu faktörün üriner enterokok enfeksiyonu gelişiminde rol oynayacağı düşünülmektedir (49).

Hemolitik enterokokların böbrek enfeksiyonuna neden olma oranları diğer suşlardan daha sıktır (7).

Ülkemizde yapılan çok merkezli bir nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları çalışmasında enterokoklar beşinci sırada en sık izole edilen etken olarak rapor edilmiştir (50).

2.5.3. Endokardit

İnfektif endokarditlerin üçüncü sıklıkta rastlanan etiyolojik ajanlarıdır. Enterokokkal bakteriyemilerde %8-30 oranında endokardit bildirilmiştir (51). Tüm endokarditlerin %5-15'inde etken olarak enterokoklar izole edilmiştir. Toplumdan kazanılmış

bakteriyemilerde 1/3 oranında iken, nozokomiyal bakteriyemilerde %1 oranındadır (31). Tüm enterokokal endokarditlerde en sık izole edilen suş *E. faecalis*' tir, bunu *E. faecium* izler (52).

Erkeklerde ve 50 yaş üstü popülasyonda daha siktir. Vakaların çoğunda altta yatan bir kalp kapak hastalığı ve prostetik kapak bulunmakla beraber, normal kapaklarda da enfeksiyona yol açabilirler. Damar içi ilaç bağımlılarında %5-53 oranında etken olabildikleri gösterilmiştir. Hastalık cerrahi yolla ya da manüplasyonlarla gastrointestinal sistemden veya çoğunlukla da genitoüriner enfeksiyon ve bu bölgeye tıbbi girişim uygulanmasından kaynaklanır. En sık aort ve mitral kapak tutulur. Enterokoklar genellikle subakut bakteriyel endokardite neden olurlar (20, 21).

2.5.4. İntraabdominal ve pelvik enfeksiyonlar

Enterokoklar barsakta bulunan diğer aerob ve anaerob bakterilerle birlikte polimikrobiyal floranın bir parçası olduğu için ikinci sıklıkta izole edildikleri enfeksiyonlar intraabdominal enfeksiyonlardır. Bu enfeksiyonlarda, *Escherichia coli* veya *Bacteroides spp.*'e göre daha az oranda bakteriyemi yaparlar (53).

Enterokokların mikst intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak aydınlatılamamış olsa da açıkça bilinen, bu mikroorganizmaların siroz veya nefrotik sendromlu hastalardaki spontan peritonit ve peritoneal diyalizli hastalardaki peritonitin etkeni olduğudur (12, 53). İntraabdominal enfeksiyondan kaynaklanan enterokokal bakteriyemilerde mortalite % 40'tır (54). Salpenjit, endometrit, sezeryan sonrası abse gelişimi gibi pelvik enfeksiyonlara da yol açabilmektedirler (20).

2.5.5. Kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları

Enterokoklar sellülit veya diğer derin doku enfeksiyonlarına nadiren neden olabilirler bu mikroorganizma daha çok cerrahi yara enfeksiyonu, dekübit ülseri, diyabetik ayak enfeksiyonu gibi miks enfeksiyonlarda etkenlerden biri olabilir. Kronik osteomyelitlerde süperenfeksiyonlara neden olabilmektedir (28).

2.5.6. Santral sinir sistemi enfeksiyonları

Enterokokal menenjit nadiren görülür ve genellikle santral sinir sisteminde anatomik bir defekt, geçirilmiş beyin ameliyatları veya kafa travması veya ventrikülo-peritoneal şant gibi predispozan faktörlerin varlığında ortaya çıkabilir. Ayrıca bakteriyemiler, AIDS ve akut lösemi gibi immünsüprese hastalarda da VRE menenjiti görülebilir. Etken diğer enterokok enfeksiyonlarında olduğu gibi sıklıkla *E.faecalis* olup daha seyrek olmak üzere *E. faecium*'dur (21).

2.5.7. Solunum sistemi enfeksiyonları

Enterokoklara bağlı solunum yolu enfeksiyonları oldukça nadirdir. Enterokokların neden olduğu pnömoni ve akciğer apsesi olguları genellikle şiddetli hastalığı olan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan olgulardır (54).

2.5.8. Neonatal enfeksiyonlar

Menenjit veya bakteriyemi ya da ikisi ile birlikte, solunum güçlüğü, letarji ve ateşle karakterize, uygun antibiyotik tedavisine iyi cevap veren bir tablodur (53). *E. faecalis* veya *E. faecium*'un etken olduğu sepsis daha sık prematür veya düşük doğum ağırlıklı bebeklerde özellikle nazogastrik tüple beslenme, intravasküler kateter bulunması gibi durumlarda görülür (55).

2.5.9. İmmun sistemi baskılanmış hastalar

Böbrek transplant hastalarında, enterokoklar sıklıkla rastlanılan mikroorganizmalar olup bakteriyemi, üriner sistem ve cerrahi alan enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca son dönem böbrek yetmezliğinin kendisi de VRE gelişmesi açısından bir risk faktörüdür (56). Yapılan bir çalışmada, böbrek transplant hastalarında VRE'nin fekal kolonizasyon prevalansı %13.6 olarak raporlanırken, bu oranın diğer hemodiyaliz hastaları ve yoğun bakım hastalarında gözlenenenden daha yüksek olduğu bildirilmiş ve bunun da transplant öncesi ve sonrası vankomisin kullanımına bağlanmıştır (9).

2.6. Enterokoklarda Antimikrobiyal Direnç

Nozokomiyal enterokokal enfeksiyonlar, hastanın antibiyotik kullanımı sonucu intestinal florasında bulunan duyarlı suşların ortadan kalkmaları ile birlikte antibiyotik dirençli, sitolitik toksin oluşturma gibi virülans özelliklerine sahip suşların intestinal floraya hakim olması ile başlar. Bu suşlar translokasyonla endojen kökenli çevreye yayılmak sureti ile de duyarlı hastalarda ekzojen kökenli enfeksiyonlara yol açarlar. Bu suşlarda görülen antibiyotik direnci suşların intestinal florada seçilip çoğalmasını kolaylaştırırken, sitolitik toksin ve jelatinaz gibi faktörler de doku invazyonunu kolaylaştırmaktadır (57, 58).

Enterokoklar, klinik kullanımda olan birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir. Bu nedenle hiçbir antibiyotik, tek başına enterokoklara karşı bakterisidal etki gösterememektedir. Ayrıca kullanımda bulunan tüm antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilme (mutasyon veya plazmid/transpozon aracılığıyla genetik materyalin transfer edilmesi) özelliğine sahiptir. Bu nedenle, özellikle ciddi enterokokal enfeksiyonların tedavisi oldukça güçtür. Bakterisidal etki sağlayabilmek için kombinasyon tedavileri gerekmektedir (20, 59).

Enterokoklar son yıllarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak giderek daha sık karşılaşılan ve antimikrobiyal ajanlara direnç oranlarında önemli artışlar kaydedilen bakterilerdir. Bu iki faktörden dolayı dirençli enterokoklar antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı ortamlarda hızla yayılabilirler (55, 60). Enterokoklarda antimikrobiyal direnç iki ana başlık altında incelenebilir (Tablo 4) (61).

Tablo 4: Enterokoklarda antimikrobiyal direnç

<p>İntrensek direnç: Aminoglikozid direnci (düşük düzeyde direnç)</p> <ul style="list-style-type: none">B- laktamlar (yüksek MIC değerleri)Linkozamidler (düşük düzeyde direnç)Trimetoprim - sulfametoksazol (sadece in vivo direnç)Kinupristin / dalfopristin (<i>E. faecalis</i>)
<p>Kazanılmış direnç: Aminoglikozid direnci (yüksek düzeyde direnç)</p> <ul style="list-style-type: none">B- laktamlar (PBP' lerde değişiklik)Hücre duvarına etkili ajanlar (tolerans)FlorokinolonlarLinkozamidler (yüksek düzeyde direnç)MakrolidlerPenisilin ve ampisilin (β laktamaz)RifampisinTetrasiklinVankomisinKinupristin / dalfopristinLinezolid

2.6.1. İntrensek (doğal) direnç

Bu direnç tipi türlerin tümünde bulunan kromozomal dirençtir. Enterokoklar sefalosporinlere, penisilinlere, linkozamidlere, aminoglikozidlere (düşük düzeyde) intrensek dirençlidir.

2.6.1.1. β - laktam direnci

Enterokoklardaki intrensek penisilin direnci β - laktam antibiyotiklere düşük bağlanma afinitesi gösteren penisilin bağlayan protein (PBP)5 enziminin varlığına bağlıdır. PBP5'in afinitesinde azalma sonucunda penisiline düşük düzeyde intrensek direnç gösterir. Özellikle *E. faecium* suşlarında dirençli suş oranı artış göstermektedir.

E. faecium penisilin bağlayan proteinlerinin penisiline afinitesi son yıllarda belirgin azalma göstermiş ve *E. faecium* suşlarının %85-90'ı ampisiline dirençli duruma gelmiştir. *E. faecalis* suşlarında ise ampisilin direnci sadece %2-3 oranındadır. *E. faecalis* çoğu streptokoka kıyasla penisilinlere 10-100 kat az duyarlı iken *E. faecium* ise *E. faecalis*' ten en az 4-16 kat daha az duyarlıdır (12). Çoğu *E. faecalis* izolatu penisilin ya da ampisilin 1-8 µg/mL konsantrasyonları ile inhibe olur. *E. faecium* da ise ortalama 16-64 µg/mL büyümenin engellenmesi için gereklidir. Buna rağmen bazı izolatlar daha dirençlidir (62). Bir *E. faecium*'un PBP-5 üretme yeteneğinin kaybı, bu yüksek penisilin dirençli suşun, penisiline aşırı duyarlı hale gelmesine sebep olur (63). Ayrıca, hemen hemen izole edilen tüm enterokoklar, β-laktamlara, vankomisin ve teikoplaninde dahil diğer hücre duvarına etkili ajanlara karşı tolerandır. Kısa süreli maruziyet hızla tolerans kazanılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu ajanlar enterokoklara karşı bakteriyostatik etkilidir. Üriner sistem enfeksiyonları gibi bazı enfeksiyonlarda tek başına kullanılabilirler de, menenjit, endokardit gibi bakterisidal aktivite gerektiren enfeksiyonlarda standart kombinasyon tedavisi kullanmak gereklidir. Bu antibiyotiklerin aminoglikozidlerle kombinasyonu sinerjistik bakterisidal etki göstermektedir (28).

2.6.1.2. Aminoglikozid direnci

Enterokoklarda görülen düşük düzeyde aminoglikozid direnci, bu grup ilaçların bakteri içerisine girişinin az olmasından kaynaklanır. Aminoglikozidler bakteri hücre duvarından enerji bağımlı mekanizma ile geçtiklerinden ve enterokoklarda sitokrom enzimleri olmadığından geçirgenlik azalmaktadır. Ancak aminoglikozid grubu ilaçlar, hücre duvarı sentezini engelleyen β-laktam'lar gibi antibiyotikler ile kombine edilirse zedelenen hücre duvarından daha kolay geçeceklerinden sinerjistik etki oluşacak ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri önemli ölçüde düşecektir (57).

2.6.1.3. Trimetoprim-Sulfametoksazol direnci

Çoğu enterokok suşu in vitro şartlarda trimetoprim-sulfametoksazole duyarlı olduğu halde bu ajan in-vivo şartlarda enterokoklara etkisizdir. Enterokokların ekzojen

kaynaklı folik asiti kullanarak bu antibiyotiğin etkisini azalttığı tahmin edilmektedir (7, 31).

2.6.1.4. Linkozamid direnci

Enterokoklar linkozamid grubu antibiyotiklere karşı da düşük düzeyde direnç gösterirler (64).

2.6.2. Kazanılmış direnç

Enterokokların birçok antibiyotiğe karşı kazanılmış direnç mekanizmaları da bulunmaktadır (7). Genellikle bir DNA mutasyonu ya da yeni bir DNA segmentinin transferine bağlı olarak gelişir. Bu transferden en sık sorumlu mekanizma konjugasyondur. Tetrasiklin direnci enterokoklarda konjugasyon yoluyla kazanılmış direncin en tipik örneğidir (59).

2.6.2.1. Kloramfenikol, Eritromisin ve Klindamisin direnci

Kloramfenikol direnci: Direnç genlerinin bir enterokoktan diğerine transferi ilk olarak 1964 yılında gösterilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda enterokokların %20-42'sinin kloramfenikole dirençli olduğu ve dirençten en sık sorumlu mekanizmanın kloramfenikol asetil transferaz üretimi olduğu bildirilmiştir.

Eritromisin direnci: Enterokoklarda çok sık görülen diğer bir direnç türüdür ve genellikle *ermB* geni ile ilişkilidir. Bu gen, rRNA'nın metilasyonundan sorumludur. Metilasyon nedeniyle eritromisin ribozomlara bağlanamaz. Aynı mekanizma, klindamisine yüksek düzeyde dirençten de sorumludur. *ermB* geni, Tn917 transpozonunun bir parçası olarak çeşitli plazmidler üzerinde taşınabilir (12).

Tetrasiklin direnci: Enterokoklarda tetrasiklin grubu antibiyotiklere dirençten sorumlu olan çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bunlardan *tetM* geni Tn916 transpozonu üzerinde taşınır. Enterokoklardaki diğer tetrasiklin direnç genleri *tetO* ve *tetN* dir. Bu genler muhtemelen tetrasiklinlerin ribozomlar üzerindeki etkisini inhibe eder. *TetL* geni ise enterokokal bir plazmid üzerinde taşınır. Bu direnç geni mikroorganizma tetrasiklinle

karşılaştığında amplifiye olur. *TetL* geni tetrasiklinlerin hücre dışına pompalanmasını sağlayan aktif transport sistemini de kodlar (12).

2.6.2.2. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozitlerin etkili olabilmeleri için, bakteri hücresi içine yeterli miktarda girebilmeleri gerekir. Bu antibiyotik iki yoldan bakterisidal etki gösterir.

1. Bakterinin 30S ribozomal alt ünitesine, geri dönüşümsüz bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Aminoglikozitlerin bağlandığı ribozomlarda protein sentezi sırasında mRNA'nın translasyonu gerçekleşmez ve durum bakteri ölümüne yol açar.

2. Genetik kodun yanlış okunmasına neden olur (65).

Enterokoklarda aminoglikozid direnci üç farklı mekanizma ile meydana gelir (21). Bu mekanizmalar aşağıda sıralanmıştır.

a.Permeabiliteye bağlı direnç: Aminoglikozitlere karşı, kromozomal mutasyon sonucunda, membrandaki permeabilitenin azalması ile oluşan direnç, yüksek düzeyde olmamakla birlikte, tüm aminoglikozitlere karşı çapraz direnç şeklindedir. Bu tip direnç beta-laktam antibiyotikler ile birlikte kullanılarak bertaraf edilebilir (21).

b.Aminoglikozit modifiye edici enzimlere bağlı direnç: Aminoglikozitlerdeki en sık gözlenen, yüksek düzeydeki ($MİK \geq 2000 \mu\text{g/mL}$) edinsel direnç, plazmid veya transpozon kaynaklı asetiltransferaz (AAC), adeniltransferaz (ANT), fosfattransferaz (APH) gibi modifiye edici enzimlerle antibiyotiğin inaktive edilmesidir. Yüksek düzey gentamisin direncine neden olan enzim, 6'asetiltransferaz-2'' fosfo-transferaz enzim kompleksi olup streptomisin hariç klinik kullanımda olan tüm aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin ve netilmisin) yüksek düzeyli direncin ortaya çıkmasında etkilidir. Streptomisine enzimatik yoldan kazanılan yüksek düzey direnç ise 6 adeniltransferaz (AAD-6) enzimi ile olmaktadır. Bu enzim varlığında, sadece streptomisine karşı yüksek düzeyde direnç gelişmektedir. *E. faecalis* kökenlerinde yüksek düzeyde aminoglikozid direnci yoksa penisilin ile aminoglikozit antibiyotikleri arasında sinerjizm görülür. *E. faecium* kökenlerinde ise yüksek düzey aminoglikozid direnci bulunmasa da penisilin ile sadece gentamisin ve streptomisin sinerjistik etkili olabilir. Çünkü *E. faecium* kökenleri intrinsik olarak tobramisin, netilmisin, kanamisin ve sisomisini modifiye eden 6 asetiltransferaz (AAC-6) enzimini oluştururlar. AAC-6 enzimi *aac(6)* geni tarafından kodlanır. Bu durumda yüksek düzey aminoglikozit

direnci olmamakla beraber (MİK<2000 mg/L) hücre duvarına etkili antibiyotikler ile sayılan bu 4 aminoglikozit arasındaki sinerji bozulmaktadır (21).

c.Ribozomal direnç: Bir ribozomal proteinde oluşan tek bir aminoasit değişikliği, o ribozomun antibiyotiğe karşı, düşük afinite göstermesine neden olur. Bu direnç tipi klinik olarak oldukça nadir görülmekte ve diğer aminoglikozidlere karşı çapraz direnç oluşmamaktadır (21).

2.6.2.3. β -laktam direnci

β -laktam direnci enterokok cinsi bakterilerin tipik özelliğidir. Enterokoklar iki ayrı direnç mekanizması ile β -laktam antibiyotiklere direnç kazanır. Direncin major mekanizması, kromozomal olarak düşük afiniteli PBP5 miktarının artması sonucu penisilin hücre içine girişinin azalmasıdır. Penisilin direnci, enterokoklarda bulunan PBP5 miktarı ile doğru orantılıdır ve sıklıkla *E. faecium* suşlarında görülür. PBP5 sentez yeteneğinin kaybının, penisiline oldukça dirençli suşların hiper duyarlı olmasına neden olduğu gösterilmiştir (64, 66). β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin diğer mekanizması ise β -laktamaz üretimidir. β - laktamaz üreten enterokoklar nadir olarak izole edilmektedir. β -laktamaz üreten ilk suş 1981 yılında Murray ve arkadaşları tarafından ABD’de tanımlanmıştır. β - laktamazların çoğu yüksek düzeyde gentamisin direnç genini de taşıyan bir plazmid üzerinde kodlanmıştır. Enterokoklardaki β -laktamazlar penisilin, ampisilin, piperasilin ve diğer üreidopenisilinleri hidrolize eder; penisilinaza dirençli penisilinleri, sefalosporinleri ve imipenemi etkilemez. Stafilokoklardan farklı olarak, enterokoklarda β -laktamaz üretimi konstitüf, düşük seviyede ve inokülüm bağımlıdır (64-67).

Tolerans: Hemen hemen tüm izole edilen enterokoklar, beta laktamlara, vankomisin ve teikoplanin de dahil diğer hücre duvarına etkili ajanlara karşı tolerandırlar. Kısa süreli maruziyet, hızla tolerans kazanılmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu ajanlar enterokoklara karşı bakteriyostatik etkilidir. Üriner sistem enfeksiyonları gibi bazı enfeksiyonlarda tek başına kullanılabilirler de menenjit, endokardit gibi bakterisidal aktivite gerektiren vakalarda standart kombinasyon tedavisi kullanmak gereklidir. Aminoglikozidlerle kombinasyonu, sinerjistik bakterisidal etki göstermektedir (28).

2.7. Glikopeptid antibiyotikler

Bu grupta vankomisin, teikoplanin, daptomisin, ramoplanin, ristosetin ve aktinoidin bulunur.

2.7.1. Vankomisin

Yaklaşık 1500 dalton molekül ağırlığında trisiklik polipeptiddir. Çözünürlüğü pH 3-5 arasında en iyidir. Sodyum bikarbonat, heparin, penisilinler, sulfonamidler, kloromfenikol, kortikosteroidler, aminofilin, vitamin preparatları, varfarin, barbituratlarla karıştırılıp uygulanmamalıdır. Çünkü çözünmez bileşikler oluşturur. Bakterisidal bir antibiyotik olan vankomisin bakteri hücre duvarı sentezi ikinci aşamasında peptidoglikan polimerlerini oluşturarak öncül maddelerden Dalanil-D-alanin içeren peptitlerle kompleks oluşturur ve transglukozilasyon reaksiyonunu inhibe ederek peptidoglikan sentezine katılmasını engeller. Ayrıca sitoplazmik membran geçirgenliğini değiştirerek protoplast hasarına yol açabilmekte ve RNA sentezini seçici olarak önleyebilmektedir. Postantibiyotik etkiye sahiptir (68).

Gram pozitif kok ve basillerin büyük çoğunluğu vankomisine duyarlıdır. Hem *S. aureus* ve hem de *S. epidermidis*, metisiline dirençli suşlar da dahil olmak üzere vankomisinin 1-5 mg/L gibi düşük konsantrasyonlarda inhibe olurlar. Yakın zamanda Vankomisin intermediate *S. aureus* (VISA) suşları Japonya'dan sonra Amerika ve Avrupa'da da klinik izolasyonları arasında tanımlanmıştır (69). Vankomisin için MİK 8-16 mg/L'dir. Heterojen karakter gösteren suşlarla meydana gelen enfeksiyonlarda glikopeptidlerle tedavi başarısızlığı oluşabilir (70).

Vankomisin serumda ulaşılabilen konsantrasyonlarda streptokoklar için bakterisidal etki gösterirken enterokoklar için bakteriyostatiktir. Enterokok suşlarının % 90'ını üremesi 6 mg/L ve altındaki vankomisin konsantrasyonlarında inhibe olur. Vankomisin dirençli *E. faecium* izolatlarında direncin plazmide bağlı olduğu ve bunun diğer Gram pozitif bakteriler aktarılabildiği gösterilmiştir (71).

Sistemik enfeksiyonlar için kullanımı intravenöz uygulama ile sınırlıdır. Normal renal fonksiyonlu bir erişkinde 12 saat ara ile 1 gr (15 mg/kg) veya 6 saat ara ile 500 mg (6.5-8 mg/kg) dozda kullanılır. Altı saat aralarla tekrarlanan 500 mg'lık dozlardan sonra serum düzeyi ortalama 8 mg/L'dir. Atılımı esas olarak böbreklere olur. İdrarda 100-300

mg/L konsantrasyona ulaşmaktadır. Serum vankomisin klerensi ile kreatinin klerensi arasında lineer bir ilişki vardır ve birbirlerine oranı %70'dir. Göz dokularına ve normal kişilerdeki meninkslere geçişi iyi değildir. Ancak inflamasyon durumunda ise serum düzeyinin %1-37'si oranında beyin omurilik sıvısında (BOS) saptanabilir ve terapötik düzeylere ulaşabilir. Asit, perikard ve eklem sıvısında serum düzeyinin %75'ine; plevrada ise %50'sine ulaşır. Apseye penetrasyonu iyi, kemiğe penetrasyonu orta düzeydedir (43). Oral alındığında absorbe olmaz. Sekiz saat ara ile 500 mg oral verildiğinde barsak lümeninde 1000-9000 mg/L; 6 saat ara ile verildiğinde ise 100-800 mg/L konsantrasyona ulaşır. Böbrek yetmezliğinde doz ayarı gerekir. Nedeni bilinmemekle birlikte karaciğerde yıkılmamasına rağmen karaciğer yetmezliğinde de doz ayarı gerekmektedir. Yanıklı hastalarda, gebelerde ve obez hastalarda ise vankomisin serum yarılanma ömrü kıaldığından daha yüksek dozlar gerekir (68).

Vankomisin ile tedavi endikasyonları ise;

1. Parantral vankomisin kullanımı ciddi metisilin rezistan *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarında veya β -laktam allerjisi gelişen stafilokok enfeksiyonlarında ilk seçilecek tedavidir. Tedaviye cevabın yeterli olmadığı veya etkenin toleran bir suş olduğu *in vitro* saptandığı durumlarda bir aminoglikozid veya rifampisin ile veya her ikisi ile birlikte tedaviye devam edilebilir.
2. Toksik *C. difficile* suşlarının neden olduğu psödomembranöz enterokolitte 6 saat ara ile 125 mg oral vankomisin 5-10 gün verildiğinde tedavi sağlanır. Bakteri sporlara etkisiz olduğu için taşıyıcılığı önlemez (72).
3. Çoğul antibiyotik dirençli difteroidlerle oluşan enfeksiyonlarda vankomisin ilk seçilecek ilaçtır.
4. Penisiline allerjik hastalarda gelişen viridans streptokok ve *S. bovis* endokarditinde vankomisin güvenle kullanılabilir. Ancak enterokok enfeksiyonlarında bakteriyostatik olduğundan bir aminoglikozid ile kombine edilerek kullanılmalıdır (73).

Vankomisin en sık görülen yan etkisi intravasküler verildiğinde görülen kırmızı adam sendromudur. İnfüzyon hızına bağlı olarak gelişen baş, yüz, ense ve göğsün üst kısmında eritematöz flaş ile birlikte nadiren tehlikeli olabilen hipotansiyondur (74). İnfüzyon öncesi verilen antihistaminiklerle önlenmektedir. İntravenöz olarak hızlı verilirse kardiyak arrest gelişebilir. Şimik flebit (%5-13), cilt döküntüleri, lökopeni (2. haftadan sonra) görülebilir. Vankomisin diğer önemli yan etkileri ototoksisite (başlangıç belirtisi tinnitus) ve nefrotoksisitedir (75).

2.7.2. Teikoplanin

1970'li yılların sonlarında *Actinoplanes teichomyceticus*'un fermentasyon ürünlerinden elde edilmiş, 1984 yılında Avrupa'da ilk kullanıma girmiştir. İki bin dalton molekül ağırlığındadır. Diğer glikopeptitlerden ayıran en önemli özelliği yapısındaki yağ asidi nedeni ile vankomisininden daha lipofiliktir (76). Genellikle stafilokoklara vankomisin kadar, streptokok ve klostridiuma en az 4-8 kat daha etkilidir. Enterokok suşları için vankomisininden daha aktif olmakla birlikte bu suşlara teikoplanin de bakteriyostatik etkilidir. Aminoglikozid ve rifampisin ile sinerjik olabilir (77). Fizyolojik pH'da çözünebilirliği nedeni ile intramusküler uygulanabilir. Lipofilik yapısı nedeni ile doku ve hücrelere penetrasyonu çok iyidir. Ancak kemik dokusu, periton sıvısı ve BOS'ta ulaştığı düzeyle ilgili henüz fazla bilgi yoktur. Muhtemelen yüksek proteine bağlanma oranları ve doku penetrasyonu özellikleri eliminasyon yarı ömrünün çok uzun olmasına yol açmaktadır (33-48 saat). Sabit kan düzeyini sağlamak için 5 tedavi gününün geçmesi gerekir. Başta MRSA ve metisilin dirençli *S. epidermidis* (MRSE) olmak üzere dirençli Gram pozitif bakterilerin etken olduğu sepsis, endokardit, pnömoni, yumuşak doku enfeksiyonu ve osteomyelit gibi ağır enfeksiyonlarda kullanılır. Özellikle ağır enfeksiyonlarda 12'şer saat ara ile 3 kez 6- 7 mg/kg dozdan sonra aynı dozun 24 saat ara ile sürdürülmesi önerilmektedir. Bakteriemi ve endokarditte 2x2 gr/gün yükleme dozu sonrası 2 gr/gün idame dozu uygulanır (78).

2.8. Glikopeptid Direnci

Enterokoklarda vankomisin ve teikoplanin en çok kullanılan glikopeptitlerdir. Enterokoklarda, normal şartlar altında, peptidoglikan sentezinde, iki molekül D-Alanin bir ligaz enzimi ile bağlanır ve "D-Ala-D-Ala" yı oluşturur. Daha sonra UDP-N-asetil muramil tripeptide eklenerek UDP-N-asetil muramil pentapeptit meydana getirir. Bu peptid oluşmaya başlayan peptidoglikana bağlanır, kros bağların oluşumunu sağlar ve peptidoglikan tabakanın gücüne katkıda bulunur. Vankomisin pentapeptit prekürsör ünitesinin D-Ala-D-Ala kısmına yüksek affinite ile bağlanır ve peptidoglikan zincire bağlanmasını bloke ederek kros bağların oluşumunu önler. Ancak peptidoglikan yan zincirine D-Ala-D-Ala yerine ligaz enzimi ile D-Ala-D-Laktat veya D-Ala-D-Serinin

sentezlenerek bağlanması sonucunda, vankomisin buraya bağlanma yeteneği azalır, hücre duvarı sentezi devam eder ve sonuç olarak vankomisine karşı direnç gelişir. Direncin sınıflandırılması önceleri, fenotipik olarak, MİK değerlerine göre yapılmıştır. Günümüzde ise sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. *VanA*, *VanB*, *VanD* ve *VanG* tipi dirençte D-Ala-D-Laktat, *VanC* ve *VanE* tipi dirençte ise, D-Ala-D-Serin sentezlenmektedir (64, 67, 79).

Vankomisin dirençli enterokoklardaki fenotipik direnç en sık *VanA* ve *VanB* tipindedir. *VanA* tipi yüksek düzey direnç disk difüzyon, E test ve otomatize buyyon mikrodilüsyon yöntemleriyle kolaylıkla belirlenir. Ancak *VanB* fenotipi düşük düzey vankomisin direnci bu yöntemlerle bakıldığında duyarlı olarak rapor edilebilir. Bu durumun önlenmesi için 6 µg/mL vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar tarama testi ile vankomisin direncine bakılmalıdır (80).

Enterokoklarda glikopeptid antibiyotiklere direnç, ilk kez 1988 yılında bildirilmiş ve daha sonra tüm dünyada görülmeye başlanmıştır (81). Ülkemizde ilk VRE olgusu 1998 yılında Antalya'dan bildirilirken, sonraki yıllarda çeşitli hastanelerden bildirim artmıştır (82, 83).

Tablo 5. Enterokoklarda direnç fenotiplerinin özellikleri

	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG
Peptido- glikan Prekürsör	D-Ala- D-Laktat	D-Ala- D-Laktat	D-Ala- D-Serin	D-Ala- D-Laktat	D-Ala- D-Serin	<i>D-Ala- D-Laktat</i>
Ligaz geni	<i>VanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1 vanC2 vanC3</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>
Direnç geninin kaynağı	Kazanılmış	Kazanılmış	Yapısal	Kazanıl mış	Kazanıl mış	Kazanıl mış
Vankomisin MİK (µg/mL)	64->1000	4->1000	2-32	64-256	16	16
Teikoplanin MİK (µg/mL)	16-512	0.5->32	0.5-1	4-32	0.5	0.5
Direnç geninin bulunduğu türler	<i>E. faecium E. faecalis E. casseliflavus E. gallinarum E. durans E. mundtii E. avium</i>	<i>E. faecalis E. casseliflavus E. gallinarum E. faecium</i>	<i>E. gallinarum E. casseliflavus E. flavescens</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Transfer Edilebilirlik	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır

2.8.1. Van A tipi direnç

Tüm glikopeptid direnç tipleri arasında en ayrıntılı olarak incelenmiş olanıdır. *VanA* izolatları hem vankomisine (MİK \geq 64 µg/ml) hemde teikoplanine (MİK \geq 16 µg/ml) yüksek düzeyde dirençlidir. Bu direncen esas olarak Tn1546 transpozonu ve bu transpozonla ilişkili elemanlar üzerinde taşınan *VanA* gen kümesi sorumludur. *VanA* gen kümesinin hem transfer edilebilen hemde transfer edilemeyen plazmidler ve bakteriyel kromozomlar üzerinde bulunabildiği bildirilmiştir. *VanA* geni esas olarak *E. faecium*'da tanımlanmıştır. Ancak başta *E. faecalis* olmak üzere, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* ve enterokok dışı bazı türlerde bulunduğu gösterilmiştir (64-66).

Tn 1546 transpozonu 9 ayrı gen içermektedir. Bu genlerden ikisi transpozaz ve rezolvaz aktivitesi gösterir. Bu iki gen Tn1546'nın transpozisyonundan, transpozon üzerindeki diğer genler (*VanR*, *VanS*, *VanH*, *VanA*, *VanX*, *VanY*, *VanZ*) ise glikopeptid direncinden

sorumludur. Bu genler *E. faecium* da plazmid üzerindedir. *VanR* ve *VanS* iki komponentli bir regülatör sistem oluşturur. *VanS* glikopeptidlerin ortamdaki varlığı veya etkileri ile ilişkili sinyali saptayarak sinyali iletir. Buna bağlı olarak *VanR* kendi promoter bölgesini ve *VanH*, *VanA*, *VanX* promoter bölgesini aktive eder. Bu aktivasyon sonucunda *VanH*, *VanA* ve *VanX* genlerinin transkripsiyonu gerçekleşir. *VanH* bir dehidrogenazdır ve pruvatu D-laktata redukte eder. *VanA* ligaz D-laktatı D-ala-D-lac sentezi için kullanır. Ancak vankomisine duyarlı olan normal D-ala-D-ala prekürsörü, ortamda bulunduğu sürece D-ala- D-lak sentezi yüksek düzeyde vankomisin direnci oluşturmak için yeterli değildir. *VanX* bir D, D-dipeptidazdır ve ortamda bulunan D-ala-D-ala'nın hidrolizinden sorumludur. *VanY* ise bir D, D-karboksipeptidazdır ve görevi pentapeptid prekürsörlerin D-ala terminalini uzaklaştırmaktır. Vankomisin ve teikoplaninin geride kalan tetrapeptid prekürsör için afinitesi düşüktür. Bütün bu basamaklar sayesinde hücre duvarının glikopeptid antibiyotikler varlığında bile devam etmesi sağlanır. *VanZ* nin vankomisin direncindeki rolü tam olarak bilinmemekte, teikoplanin direncinde rolü olduğu düşünülmektedir. Ancak mekanizma henüz tam olarak anlaşılammıştır. *VanZ*, *VanA* fenotipinin ekspresyonu için mutlak gerekli değildir (64, 84).

İndüklenebilir VanA direncinde yalnızca vankomisin varlığında oluşan PBP'lerin artışı sonucunda beta-laktam antibiyotiklere karşı hipersensitivite meydana gelir. Bu da vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde vankomisin-beta-laktam kombinasyonunun başarısını açıklamaktadır (85).

2.8.2. Van B tipi direnç

Enterokoklarda *VanB* tipi glikopeptid direnci *VanA* ligaza yapısal benzerlik gösteren *VanB* ligaz ile oluşur. *VanB* proteini yine D-ala-D-ala-lac pentapeptidinin oluşumuna neden olur. Kromozomal yerleşimlidir. Ancak Tn1547, Tn5382 transpozonu ve plazmidler üzerinde de taşınarak transfer edilebildiği de bildirilmiştir. *Van B* tipi direnç taşıyan enterokok izolatları vankomisine değişken düzeyde direnç gösterirken (MİK=4- >1000 µg/ml) teikoplanine duyarlıdır. *VanB* tipi direnç esas olarak *E. faecalis* ve *E. faecium* da tanımlanmıştır. Buna ek olarak nadiren *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum* ve enterokok dışı bazı türlerin de *VanB* gen kümesi taşıdığı bildirilmiştir. *VanB* gen kümesinde bulunan 6 gen *VanA* kümesindeki genlerle homoloji gösterir. *VanA* gen

kümesinden farklı olarak *VanB* gen kümesinde *VanZ*'nin karşılığı yoktur. *VanB* gen kümesinde görevi tam olarak anlaşılabilen *VanW* geni mevcuttur. *VanRB-VanSB* sistemi vankomisin tarafından indüklenir ancak teikoplanin tarafından indüklenmez. Bu nedenle *VanB* tipi direnç taşıyan suşlar teikoplanine duyarlıdır. *VanB* izolatlarının vankomisin tarafından indüklenmesi sonucunda teikoplanine de direnç geliştiği bildirilmiştir. Ayrıca bu suşlarda glikopeptid tedavisi altında teikoplanin direnci geliştiği de gösterilmiştir (84).

2.8.3. *Van C* tipi direnç

VanC direnç fenotipinin özelliği vankomisine düşük düzeyde dirençli teikoplanine ise duyarlı olmasıdır. *VanC* tipi direnç, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. flavescens* suşlarında görülen intrinsek bir direnç türüdür. Bu suşlarda hemen her zaman *VanC* geni bulunmasına rağmen vankomisin için MİK değeri genellikle 8-16 µg/mL arasındadır (orta duyarlı). Bu direnç fenotipinin *VanC-1*, *VanC-2* ve *VanC-3* olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır ve genlerin türe spesifik olduğu düşünülmektedir. *VanC-1* *E. gallinarum*'da, *VanC-2* *E. casseliflavus*'ta, *VanC-3* ise *E. flavescens*'te daha sıktır. *E. casseliflavus* ile *E. flavescens* in yüksek olasılıkla aynı türü temsil ettiği kabul edilmektedir ve *VanC-2* ile *VanC-3* ün %98 oranında benzer olduğu gösterilmiştir. *VanC-1*, *VanC-2* / *VanC-3* ile %73, *VanA* veya *VanB* ile %37-39 oranında benzerlik gösterir. Kromozom üzerinde lokalize olan *VanC* operonu beş genden oluşmaktadır. *VanH* ve *VanHB*'nin homoloğu olan *VanT* hücre zarına bağlı bir serin rasemaz enziminin kodlanmasından ve D-Ser sentezinden sorumludur. *VanC* gen kümesinde *VanXYC*, dipeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerini kodlar. *VanRC* ve *VanSC*'nin aminoasit dizileri *VanR* ve *VanS*'ye sırasıyla % 50 ve % 42 oranında benzerlik gösterir. Fonksiyonları ise aynıdır. *VanC* gen kümesi D-ala-D-ser ile sonlanan peptidoglikan prekürsörlerinin sentezinden sorumludur. Buna ek olarak *E. casseliflavus* ve *E. gallinarum*'da Dala- D-ala sentezleyen bir sistemde bulunmaktadır. *VanC* fenotipinde vankomisine düşük düzeyde ve değişken direnç görülmesinin nedeni her iki sistemin birlikte bulunmasıdır. Daha fazla miktarda D-ala-D-ala üreten suşlar vankomisine daha duyarlıdır (84, 86).

2.8.4. Van D tipi direnç

İlk kez 1991 yılında New York hastanesinde bir *E. faecium* izolatında *VanD* olarak tanımlanan yeni bir vankomisin direnç geni tanımlanmıştır. Bu suşlar 64-256 µg/ml vankomisin ve 4-32 µg/ml teikoplanin ile inhibe edilmiştir. Bu genin; *Van A* ve *Van B* ligaz genlerine % 67 oranında benzerlik gösterdiği, kromozomda yerleştiği ve konjugasyonla diğer enterokoklara transfer edilemediği anlaşılmıştır. Ancak *VanD* suslarında D,D dipeptidaz aktivitesi belirlenmemiştir ve karboksipeptidaz aktivitesi ise düşük düzeydedir. D,D-dipeptidaz aktivitesi bulunmamasına rağmen *VanD* gen kümesi *VanXD*, *VanRD*, *VanSD*, *VanHD* genlerini içermektedir (57).

2.8.5. Van E tipi direnç

VanE vankomisin direnç geni, vankomisine düşük seviyede dirençli (MİK 16 mg/ml) ve teikoplanine duyarlı (MİK 0.5mg/ml) *E. faecalis* BM4405 suşunda tanımlanmıştır. Bu yeni direnç fenotipi intrinsik *VanC* tipi dirence benzer. Aminoasit dizisi *VanC*'ye % 55, *VanA*'ya % 45, *VanB*'ye % 43 ve *VanD*'ye % 44 oranında benzemektedir. Ancak *VanE* tipi direncin genetik belirleyicisi farklıdır ve interensek bir direnç tipi değildir. *VanE* geni kromozomda yerleşmiştir ve transfer edilemez (87).

2.8.6. Van G tipi direnç

Bu direnç tipi *E. faecalis* WCH9 suşunda tanımlanmıştır. Bu suş vankomisine düşük düzeyde (MİK=16µg/mL) dirençli, teikoplanine duyarlıdır (MİK=0.5 µg/mL). Bu direnç tipi transfer edilemez. *VanG* gen kümesinin ürünü diğer Van genlerinin ürünlerine %50'den daha az aminoasit dizilim benzerliği göstermektedir (79).

2.8.7. Vankomisine bağımlı enterokoklar (VDE)

Vankomisin tedavisi altındaki hastalardan alınan primer kültürlerde çoğunlukla *VanB* tipi dirence sahip enterokokların ürettiği rapor edilmiştir. Bu izolatlar subkültürleri yapıldığında üreyememekte ancak vankomisin diski çevresinde veya vankomisin içeren besiyerlerinde üreyebilmektedirler. Vankomisin bağımlı *E. faecalis* ve *E. faecium* kan,

idrar ve dışkıdan izole edilmiştir. İzole edilen hastalarda vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik tedavisi ve daha önce izole edilmiş bir VRE hikayesi mevcuttur. Bu VRE ile VDE “pulsed field gel” elektroforezi ile benzer DNA paterni göstermişlerdir. *VanA* ve *VanB* tarafından sentezlenen D-ala-D-lac vankomisin indüksiyonu sonucunda üretilmektedir. Diğer bir deyişle vankomisin eksikliğinde hücre yaşamı için ve hücre duvarı sentezi için gerekli olan komponentleri üretememektedir (64).

Vankomisin bağımlı enterokoklar ilk kez 1993’de VRE ile kolonize olan, vankomisin ile tedavi edilen bir hastanın idrar örneğinden izole edilmiştir (88). Sonraları VD *E.faecalis* ve *E. faecium* çeşitli vücut bölgelerinden izole edilmiştir. Bu vakaların ortak özelliği vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik kullanma öyküsüdür (88, 89).

2.9. Enterokok Enfeksiyonlarında Korunma ve Kontrol Önlemleri

Enterokok enfeksiyonlarının çoğu endojen kökenli olup, barsaklardan translokasyonla endojen kökenli sistemik enfeksiyona dönüşür. Ancak, hastanelerde yatan hastalarda, kolonize hasta ve kontamine çıkartıları ile direkt temasla, personelin kontamine elleriyle kontamine yüzeylerle temasla veya kontamine tıbbi aletler yoluyla indirek olarak hastane enfeksiyonu şeklinde bulaşın da mümkün olduğu gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonlarında enterokok enfeksiyonlarının, özellikle de tedaviye cevap vermeyen VRE/GRE gibi çoklu ilaç direnci gösteren suşlarla oluşan enfeksiyonların, 1980’li yıllardan sonra artış trendine girmesi ile Center for Disease Control and Prevention (CDC) ye bağlı “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee” (HICPAC) hastanelerde VRE yayılımını kontrol altına alabilmek amacı ile alınması gereken tedbirleri içeren bir rehber yayınlamıştır (90, 91).

Bu rehberde önerilen tedbirler;

a.Hastane personelinin eğitimi: Doktor, hemşire, hasta bakımından sorumlu personel, laboratuvar çalışanları, eczacılar ve öğrenciler gibi bütün hastane çalışanlarına VRE’nin önemi, epidemiyolojisi ve kontrolünün dair eğitim verilmelidir. VRE kontrol yöntemleri ve VRE yayılımını önleyici ilkeler konusunda düzenli olarak yılda en az bir kez eğitim yapılmalı ve VRE sıklığında artış olduğunda bilgi yenileme eğitimi şeklinde tekrarlanmalıdır (90, 92).

b.Kısıtlı vankomisin kullanımı: Dirençli mikroorganizmaların kontrolünde antibiyotik kullanımının kısıtlanması son derece önemlidir. Hastanelerde uygun olmayan endikasyonlarda vankomisin kullanımı VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonu için önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca üçüncü kuşak sefalosporinler ve anti-anaerobik etkinliği olan antibiyotiklerin kullanımı da riski artırmaktadır. Bu sebeple özellikle VRE kontrolünde antibiyotik kullanımı konusunda eğitim çalışmalarına önem verilmeli, HICPAC önerileri dikkate alınmalıdır (90-92).

Vankomisin kullanılması önerilen durumlar (91).

- Beta-laktamlara dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar,
- Gram pozitif bakteri enfeksiyonu olan ve penisilin alerjisi bulunan kişiler,
- Hayatı tehdit eden, metronidazol tedavisine cevap vermeyen antibiyotikle ilişkili enterokolitler,
- Yüksek endokardit riski taşıyan hastaların profilaksisi,
- MRSA veya metisiline dirençli MRSE oranı yüksek olan hastanelerde uygulanan büyük cerrahi girişimlerden önce profilaktik uygulanabilir. (profilaksi maksimum iki doz uygulanmalıdır).

Vankomisin kullanılmasının önerilmediği durumlar (91).

- Rutin cerrahi profilaksi,
- MRSA oranı yüksek olmayan hastanelerde, febril nütropenik hastalardaki ampirik tedavi,
- Aynı anda alınmış çift kan kültürünün birinde koagülaz-negatif stafilokok üremesi,
- Ampirik olarak başlanan vankomisin tedavisine kültürde beta-laktam dirençli mikroorganizma izole edilmemiş olmasına rağmen devam edilmesi,
- Kateter enfeksiyonlarına karşı profilaksi,
- Gastrointestinal sistemin selektif dekontaminasyonu,
- MRSA kolonizasyonunun eradikasyonu,
- Antibiyotik kullanımına bağlı kolitlerin başlangıç tedavisi,
- Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanların rutin profilaksisi,
- Sürekli ayaktan periton diyalizi kullanan hastaların rutin profilaksisi,
- Böbrek yetmezliği olan hastalarda beta-laktam antibiyotiklere duyarlı enfeksiyonların tedavisi,
- Vankomisin içeren solüsyonların irrigasyon amacıyla ya da topikal olarak uygulanması

c.Mikrobiyoloji laboratuvarının etkin kullanımı: Mikrobiyoloji laboratuvarı tüm hastane enfeksiyonlarında olduğu gibi VRE sürveyansında ve yayılımının önlenmesinde oldukça önemli bir basamaktır. VRE ile kolonize veya infekte hastaların en kısa sürede ve doğru olarak tespit edilmesi, duyarlılık sonuçlarının belirlenmesi, kontrol önlemlerinin erken dönemde uygulanabilmesini ve yayılımın sınırlandırılmasını sağlar. Bir hastanede VRE bir kez izole edildiğinde mutlaka vankomisin duyarlılığı yönünden tekrar test edilmesi ve enfeksiyon kontrol komitesine ve hastanın izlendiği servise bildirilmesi gerekir. Böylece sonuç belli olana kadar hastanın izole edilmesi sağlanmalıdır. Rutin tarama kültürleri ile kolonizasyonun tespiti ve izole edilen VRE suşları arasındaki klonal ilişkinin moleküler tiplendirme yöntemleri ile ortaya konulması da enfeksiyon kontrol önlemleri açısından önem taşımaktadır (90-92).

d.Sürveyans kültürleri: İntestinal kolonizasyonunun belirlenmesi amacıyla sürveyans kültürlerinin alınması VRE kontrol programının en önemli basamaklarından birisidir. Prevalans taramaları yeni bir VRE pozitif hasta tespit edildiğinde sadece aynı odada izlenmekte olan hastaların taraması ile sınırlı olabileceği gibi, aynı servisteki bütün hastaların veya yoğun bakım, transplantasyon, hematoloji onkoloji ünitesi gibi birimlerde izlenen yüksek risk grubundaki hastaların taraması şeklinde daha geniş kapsamlı olabilir. Kolonizasyon tespitinde diğer bir yaklaşım ise *C. difficile* toksini araştırılmak üzere gönderilen gaitaların VRE yönünden taramasıdır. Ayrıca VRE'nin yaygın olduğu hastanelerden veya bakımevlerinden transfer edilen hastalardan perirektal kültür alınması da diğer bir uygulamadır (90, 91, 93). Maryland Üniversitesi'nde yoğun bakım ünitelerinde aktif sürveyans uygulanmasının VRE geçişini %39 oranında azalttığı gösterilmiştir.

e.Gastrointestinal kolonizasyonun eradikasyonu: Vankomisin dirençli enterokok eradikasyonunda amaç, kolonizasyonu olanlarda enfeksiyon gelişme riskini azaltmak, hastanedeki VRE rezervuarını sınırlamak ve enfeksiyon kontrolüne yönelik harcamaları azaltmaktır. Ancak kalıcı eradikasyon sağlayacak antimikrobiyal tedavi henüz bilinmemektedir (90). VRE kolonizasyonunun eradikasyonunda, *Lactobacillus rhamnosus* içeren yoğurt kullanılmış ve başarılı bulunmuştur (94).

Vankomisin dirençli enterokoklar ile kolonize hastalarda spontan dekolonizasyon nadir olarak oluşmaktadır. Mayo Klinikte yapılan bir çalışmada; karaciğer ve böbrek transplantasyonu yapılmış hastalarda spontan dekolonizasyon oranı %34 bulunmuştur.

Oral basitrasin, ramoplanin ve novobiyosin gibi antimikrobiyallerin kullanımı VRE eradikasyonunda kısıtlı başarı göstermiştir (64, 95).

f.Korunma ve Kontrol: Hastane içerisinde hastalar arasında enterokok yayılımında, temasın engellenmesi yani izolasyon en önemli korunma yöntemidir. Teması ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için; sağlık personeli arasında el antisepsisi, eldiven ve koruyucu önlük kullanımı gibi uygulamalar yaygınlaştırılmalı ve özendirici tedbirler alınmalıdır. Yapılan çalışmalarda hastane personelinin ellerinin hastalar arası bulaşta önemli bir vektör olduğu gösterilmiştir. Bariyer önlemlerinin önemine vurgu yapan bir çalışmada önlük kullanımının 400.000 dolardan fazla yıllık tasarruf sağladığı bildirilmiştir (95).

VRE sürveyansının aşağıdaki şekilde yapılması önerilmektedir:

1.Sıkı temas izolasyonu;

-VRE ile infekte veya kolonize hastalar tek kişilik odalara veya VRE pozitif diğer hastalarla aynı odaya yerleştirilmeli,

-VRE pozitif hasta odasına girerken eldiven ve önlük giyilmeli; hasta odasından ayrılmadan önce eldiven ve önlük çıkarılıp eller antiseptik ajanlarla yıkanmalı ve eller yıkandıktan sonra hasta odasındaki yüzeylerle temas edilmemeli,

-VRE pozitif hastalarda kullanılan tıbbi aletler diğer hastalar için kullanılmamalı, ortak kullanılacaksa dezenfekte edilmeli ve odalar arası eşya transferinden kaçınılmalı,

2.Aktif sürveyans kültürleri alınmalıdır. VRE pozitif hasta ile aynı odada izlenen hastalardan gaita veya rektal sürüntü kültürleri alınarak kolonizasyon yönünden araştırılmalı ve VRE kolonizasyonu uzun süre devam edebildiği için, en az bir hafta arayla alınmış üç veya daha fazla negatif kültür sonucu elde edilene kadar araştırmaya devam edilmelidir.

3.VRE yayılım şekillerini ve rezervuarı belirlemek amacıyla uygun moleküler yöntemler kullanılarak klonal ilişki yönünden değerlendirilmelidir.

4.Sağlık personelinde VRE taşıyıcılığı ve buna bağlı VRE yayılımı bildirilmiş olmakla beraber sağlık personelindeki taşıyıcılık VRE için tanımlanmış önemli bulaş yollarından biri değildir. Ancak VRE yayılımı kontrol altına alınamıyorsa, sağlık personeli kronik cilt ve tırnak problemleri yönünden incelenmeli, epidemiyolojik olarak VRE yayılımı ile ilişkili olduğu belirlenen VRE taşıyıcısı personelin VRE negatif hastalara bakım hizmeti vermesinden kaçınılmalıdır (90-93, 96).

2.10. VRE Risk Faktörleri

VRE enfeksiyonu ve kolonizasyonu hastane enfeksiyonu açısından önemli bir sorundur. VRE kolonizasyonu özellikle bazı hasta gruplarında, hastanelerin bazı ünitelerinde, uzun süreli hastanede yatışlarda ve bazı antibiyotiklerin kullanıldığı hastalarda daha yüksektir. VRE kolonizasyonunda ki risk faktörlerini araştırmak için birçok çalışma yapılmış ve en önemli risk faktörlerinden birinin bazı grup antibiyotiklerin kullanımı olduğu bulunmuştur. Patel'in yaptığı bir çalışmada seftriakson ve tikarsilin klavulonik asit kullanımı VRE kolonizasyonu için risk faktörü iken piperasilin-tazobaktam kullanımı ile VRE bağlantısı kurulamamıştır (97). VRE ile kolonize kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise vankomisin kullanımı, gastrointestinal girişim, akut böbrek yetmezliği ve diabetes mellitusun varlığı (16); Padiglione ve ark. üç merkezde 15 ay süreyle yaptığı bir çalışmada ise, tikarsilin-klavulonik asit ve karbapenem kullanımı ile VRE kolonizasyonu arasında ilişki olduğu tespit edilirken, glikopeptid, sefalosporin, metronidazol kullanımları arasında bir ilişki kurulamamıştır (12). Yoğun bakım ünitesinde yapılan iki çalışmanın birinde 2.-3. kuşak sefalosporin kullanımı risk faktörü olarak tespit edilirken, vankomisin kullanımı ile bağlantı kurulamamıştır (98). Diğer bir çalışmada ise immünsüpresyon, nötropeni ve vankomisin kullanımı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, enteral beslenme, sukralfat kullanımı ile bağlantı kurulamamıştır (31). Bunun aksine diğer bir çalışmada vankomisinin kontrollü kullanılmasının VRE kolonizasyonunu azalttığı gösterilmiştir (99). Bir diğer çalışmada 3. kuşak sefalosporin ve metronidazol kullanımının en önemli risk faktörü olduğu, kinolonların ise kullanım süresi ile orantılı olarak risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (13).

Akut renal yetmezlik ve hemodiyalizin VRE kolonizasyonu açısından risk faktörü iken son dönem böbrek yetmezliği ile kolonizasyon arasında bir ilişki kurulamamıştır (100). ABD'de bugün için en önemli VRE rezervuarı hastanede yatan hastalardaki GİS kolonizasyonudur. VRE ile kolonize hastaların hemen hepsi asemptomatik olduğu için yüksek risk grubuna giren hastalardan sürveyans kültürleri alınmadığı sürece, bu rezervuarın büyüklüğünün saptanması mümkün değildir. VRE enfeksiyonları genellikle gastrointestinal kolonizasyonu takiben gelişen endojen enfeksiyonlardır. Ancak gaita ve perirektal kültürlerin negatif olduğu bazı hastalarda farklı klinik örneklerden VRE izole edilebilmesi de mümkündür. Bu, VRE'nin ekzojen yollarla da alınabileceğinin bir

göstergesidir (101). VRE önemli bir nozokomiyal patojendir ve hastane ortamında özellikle yoğun bakım ünitelerinde kolaylıkla yayılabilir. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımına bağlı olarak selektif baskı nedeniyle çalışanların ellerinde ve ortamda yasayabilir. Bu yüzden VRE rektal kolonizasyonunun prevalansı ve risk faktörlerinin saptanması önemlidir. VRE kolonizasyonunu etkileyen çeşitli faktörler; hastanede yatış süresinin uzun olması, özellikle renal yetmezlik ve nötropeni, karaciğer transplantasyonu gibi altta yatan hastalık varlığı, beslenme tüplerinin varlığı, antibiyotik (özellikle sefalosporin, anaerob etkili antibiyotikler ve vankomisin) kullanımınıdır. Her merkez VRE kolonizasyon oranını ve fekal taşıyıcılık tarama programını belirlemelidir. Bu oran %20'nin üzerinde ise VRE fekal taşıyıcılık açısından sürekli sürveyans yapılmalıdır. VRE taşıyıcılık oranı düşük ya da hiç saptanmayan ünitelerde ise risk grubunu oluşturan hastalarda nokta prevalans ile VRE taramasının daha uygun olduğu bildirilmiştir (102).

Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre VRE risk faktörlerini aşağıda özetlenmiştir (35, 103-105).

Hastaya ait faktörler:

1. Kronik böbrek yetmezliği
2. Malignite
3. Nötropeni
4. Diabetes mellitus
5. Geçirilmiş intraabdominal cerrahi
6. Organ transplantasyonu
7. APACHE II skoru (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation)

Hastaneye ait faktörler:

1. Hastanede yatış süresinin uzun olması
2. Yoğun bakım, diyaliz, transplantasyon, hematoloji-onkoloji ünitelerinde yatış
3. VRE ile kontamine ekipmanlara maruziyet
4. VRE'li hastalarla temas veya VRE ile kontamine olmuş tıbbi aletlere maruz kalmak
5. Enteral beslenme
6. Kortikosteroid kullanımı
7. Antineoplastik tedavi uygulanması
8. Sukralfat kullanımı

Antibiyotik kullanımı:

1. Vankomisin
2. 2.-3. kuşak sefalosporin
3. Metranidazol
4. Klindamisin
5. İmipenem
6. Tikarsilin klavulonik asit

2.11. Enterokok Enfeksiyonlarında Tedavi

Enterokok enfeksiyonlarının tedavisi, ilginç antibiyotik duyarlılık özellikleri göstermeleri ve bu bakterilerin duyarlılıklarının mikrobiyoloji laboratuvarınca doğru olarak tespit edilememesi nedeniyle, oldukça zor ve karmaşıktır (106).

VRE izole edilen hastalarda tedaviye başlamadan önce, kolonizasyon-enfeksiyon ayırımı yapılmalıdır. Lokal veya sistemik enfeksiyon bulgusu olmayan hastada yüzeysel alanlardan, değiştirilen intravasküler kateterlerden, intraperitoneal ve safra drenlerinden ve piyüri olmadan idrardan VRE izole edildiğinde, kolonizasyon olarak değerlendirilmelidir ve antibakteriyel tedaviye gerek yoktur (107).

Penisilin G, ampisilin, vankomisin ve teikoplanin gibi hücre duvarına etkili ilaçlar, klinik olarak erişilebilir konsantrasyonlarda enterokokların çoğuna bakteriyostatik etkilidir. Enterokok enfeksiyonlarında bakterisidal etki klasik olarak bu hücre duvarına etkili ajanlardan biri ile streptomisin veya gentamisin kombine kullanımı ile elde edilir (106).

İmmun sistemi baskılanmamış konakta oluşan üriner sistem, peritonit, yumuşak doku enfeksiyonu gibi derin yerleşimli ve intravasküler olmayan enfeksiyonlarda bakterisidal etki gerektirmeyen tek antibiyotik ile tedavi yeterlidir. Bu enfeksiyonlarda penisilin, ampisilin veya amoksisilin'den herhangi biri kullanılabilir. Önerilen tedavi süresi 7-14 gündür. Üreidopenisilinler ise karışık enfeksiyonların tedavisinde daha geniş bir spektrum elde etmek için kullanılabilir. Penisiline alerjik hastalarda veya yüksek düzeyde penisilin direnci içeren türlerde (*E. faecium*) glikopeptid antibiyotikler kullanılabilir. Nitrofurantoin enterokok suşlarının çoğunda etkili olduğundan (% 90-96) üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılabilir. Fosfomisin de in vitro enterokoklara oldukça etkili olduğundan üriner enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir (17, 106).

Kinolonlar da nitrofurontoin gibi üriner sistem enfeksiyonlarında tek başına kullanılabilir. Ancak üriner sistem enfeksiyonu dışında başka enfeksiyon varsa kullanılmamalıdır. Levafloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasin; siprofloksasine ve ofloksasine göre enterokoklara karşı in vitro daha etkilidirler. Ancak kinolonların çoğul dirençli enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde etkinliği sınırlıdır (106). Dirençli suşların gelişimine neden olacağından tek başına Rifampin kullanımından kaçınılmalıdır (108).

Enterokoklarla gelişen endokardit ve menenjit gibi diğer ciddi sistemik enfeksiyonların tedavisi sorun yaratmaktadır. Enterokokkal endokarditli hastaların çoğunda tek başına penisilin tedavisi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu tür enfeksiyonların tedavisi, enterokokların duyarlı oldukları hücre duvarına etkili bir antibiyotik ile yüksek düzeyde direnç göstermedikleri bir aminoglikozid antibiyotiği içeren bakterisidal bir kombinasyonlar ile sağlanır. Endokardit tedavisinde günlük gentamisin dozunun iki veya üçe ve streptomisin dozunun ikiye bölünerek verilmesi önerilmektedir. Enterokokların neden olduğu endokarditlerin tedavisinde dört haftalık süre genellikle yeterlidir. Ancak semptom süresi üç aydan daha uzun hastalarda, relapslarda, mitral ve prostetik kapak tutulumunda altı hafta süreli tedavi önerilmektedir. Menenjitlerde ise iki-üç hafta süren tedavilere yanıt alınmaktadır (81, 106). VRE karşı afinitesi ve BOS içine penetrasyonu oldukça iyi olan Linezolid enterokoklara karşı bakteriyostatik olmasına rağmen VRE menenjitinde kullanılabilir (106).

Endokarditin eşlik etmediği enterokok bakteremilerinde, kombinasyon tedavisinin gerekliliği konusunda fikir birliği yoktur. Böyle olguların çoğu geçicidir ve kendi kendini sınırlar. Ancak enterokok bakteremili ciddi hastalarda veya monoterapiye yanıt alınamayanlarda kombine tedavi uygulanabilir (106).

Beta-laktamaz üreten enterokok enfeksiyonlarında, imipenem ve betalaktamaz inhibitörleri ile penisilinlerin kombine olduğu ampisilinsulbaktam, amoksisilin-klavulanik asit ve piperasilin-tazobaktam gibi ilaçlar kullanılabilir. Vankomisin ve teikoplanin gibi hücre duvarına etkili ilaçlar da beta-laktamaz üreten suşların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde yer alabilir (106, 107).

Yüksek düzeyli penisilin dirençli suşlarda penisilin-aminoglikozid kombinasyonu ile sinerjistik etkileşim elde edilebilmesi için serum penisilin konsantrasyonunun, MİK değerinin iki katı olması gerekmektedir. Bu nedenle kombinasyon tedavisi ile bakteriyostatik veya bakterisidal etkileşim elde edilmesi, penisilin direncinin derecesi

ile ilişkilidir. Bakterisidal etkileşim MİK<50 mg/mL olduğunda sağlanabilir. Ancak yüksek düzeyli aminoglikozid direncinin de birlikte olması, bakterisidal tedaviyi, penisilinlerin MİK değerine bakılmaksızın olanaksız hale getirir (107).

Yüksek düzey penisilin direncine (MİK \geq 16-32 mg/mL) sahip *E. faecium* enfeksiyonlarında vankomisin verilmelidir. Çoğu vankomisin dirençli enterokoklar (özellikle *E. faecalis*) penisilin veya ampisiline duyarlıdır (MİK:0.5-2mg/mL). Bu tür VRE enfeksiyonlarının tedavisinde ampisilin veya penisilin kullanılabilir. Hem penisiline hem de vankomisine yüksek düzeyde dirençli enterokokların (genellikle *E.faecium*) tedavisi oldukça büyük sorundur. Vankomisin ve penisilin veya ampisilin kombinasyonunun bu mikroorganizmaların bazılarında in vitro koşullarda bakteriyostatik etki ettiği bildirilmiştir (106).

Aminoglikozidlere yüksek düzeyli dirence sahip suşların neden olduğu bakterisidal tedavi gerektiren enfeksiyonlarda, en iyi tedavi seçeneğinin ne olduğu henüz bilinmemektedir. Endokarditlerde daha uzun süreli (8-12 hafta) yüksek doz ampisilinin veya penisilinin, tek başına sürekli infüzyonu yararlı olabilir (106, 107).

Vankomisine dirençli *E.faecalis* enfeksiyonları, penisilin alerjisi olmayan hastalarda, 8-12 g/gün ampisilin dozları ile etkin olarak tedavi edilebilir (107).

Vankomisine dirençli *E. faecium* ise penisilin ve ampisiline daha dirençlidir. Ampisilin için MİK değeri \leq 64 mg/mL ise yüksek dozlarda ampisilin tedavide etkili olabilir. MİK değeri 100 mg/mL'nin üzerinde olan *E. faecium* suşlarında ise yeterli serum seviyesi sağlanamaz. Ampisilinin, sulbaktam ile kombinasyonu *E. faecium*'a karşı daha etkili bulunmuştur (107).

Teikoplanin, *VanB* tipi direnç taşıyan VRE suşlarının çoğuna etkilidir. Eğer yüksek düzey aminoglikozid direnci yoksa bir aminoglikozid ile birlikte kullanılarak bakterisidal etki elde edilebilir. Ancak teikoplanin tedavisi sırasında direnç gelişebileceği de bildirilmiştir. *VanB* tipi VRE'lerin etken olduğu endokarditlerin tedavisinde teikoplanin ve diğer bir aktif ajan (örn: aminoglikozid) kombinasyonu başarılı bulunmuştur (106).

Yeni geliştirilen antibiyotiklerden bazıları (kinopristin-dalfopristin, linezolid, everninomisin, LY3328 (yeni bir glikopeptid türevi) çoğul dirençli enterokokların tedavisi için çok olmasa da umut vericidir. En fazla klinik veri kinopristin-dalfopristin

(streptogramin B-streptogramin A) için vardır. Bu antibakteriyel, *E. faecalis* için etkili değil, *E. faecium* üzerine ise bakteriyostatik etkilidir.

Linezolid, oksazolidinon sınıfından sentetik bir antibiyotiktir. Vankomisine dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium*'a karşı bakteriyostatik etki göstermektedir. Klinik kullanımdaki antibiyotikleri etkileyen direnç mekanizmaları oksazolidinonları etkilememektedir. Ancak linezolid tedavisi sırasında dirençli enterokok suşlarının geliştiğini bildiren yayınlar vardır (107, 109).

Kloramfenikol, çoklu ilaç direnci gösteren *E. faecium*'a karşı in vitro aktivitesini korumaktadır. Ancak bazı VRE suşlarında kloramfenikole karşı da direnç gösterilmiştir. Kloramfenikol enterokoklara karşı bakteriyostatik etkilidir (106).

Yeni kinolonlar, özellikle klinafloksasin ve sitafloksasin VRE'lere karşı, eski kinolonlara göre daha etkilidir. VRE ile oluşturulan deneysel endokarditlerde klinafloksasin tek başına veya penisilinle birlikte etkili bulunmuştur (107).

İndüklenebilir *VanA* direncinde yalnızca vankomisin varlığında oluşan PBP'lerin artışı sonucunda, beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlılık meydana gelir. Bu durumda vankomisin dirençli enterokokların tedavisinde beta-laktam ve vankomisin kombinasyonu başarılı olabilir. İmipenem, ampisilin ve teikoplanin'in üçlü kombinasyonunun *E. faecium* endokarditinde bakterisidal olup, sinerji sağladığı gösterilmiştir (108, 110).

2.12. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Enterokoklar nozokomiyal enfeksiyonların önemli sebeplerinden olmaları ve sıklıkla çoklu ilaç direnci göstermelerinden dolayı; epidemiyolojik çalışmalar ve enfeksiyon kontrolünde bunların tip ve subtiplerinin belirlenmesine giderek artan oranda ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan başka enterokokal enfeksiyonların eksojen kazanım fikrinin desteklenmesi için de tiplendirme çalışmaları gerekmektedir. Özellikle VRE'lerin artan sıklıkta görülmesinden dolayı, ilaç direnci gösteren enterokok suşlarının yayılması ile oluşan nozokomiyal salgınların araştırılması major ilgi alanını oluşturmaktadır. Salgın araştırmalarının yanında; epidemiyolojik incelemelerde kullanılan metotlar, enterokokların farklı çevre ve konaklardaki yayılımı ve çoklu ilaç direnci gösteren suşların izlenmesinde de kullanılmaktadır. Önceleri enterokokal enfeksiyonların epidemiyolojik incelemeleri fenotipik özelliklerine göre yapılmıştır. Ancak bu

yaklaşımlar bazen yararlı bilgiler sağlamasına rağmen, zaman alıcı olmaları, tekrarlanabilirliği ve yorumlanması güç ve suşlar arasında ayırım yapmada yetersiz olmaları nedeniyle epidemiyolojik çalışmalarda kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda geliştirilen moleküler tekniklerle beraber fenotipik yöntemlerin kullanımı yararlı bilgiler sağlayabilmektedir (111, 112).

Enterokokların ayırımında oldukça başarılı olan çeşitli moleküler tekniklerin gelişimi, epidemiyolojik yönden önemli bir anlayış getirmiştir. Ayırım gücü daha yüksek tipleme tekniklerinin kullanımı sonucu, hastalar arasında direkt ve indirek temas ile ekzojen olarak kazanılabilen suşların ayırımı mümkün olmaktadır. Dirençli enterokokların hastane içinde ve hastaneler arası yayılım gösterdiği de bildirilmektedir. Kullanılan ilk moleküler teknikler, plazmid profil analizi ve restriksiyon enzim analizi (REA)'dir (111). Bu teknikler bazı durumlarda faydalı olabilmektedir, fakat kullanımlarında bazı problemler vardır. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile DNA restriksiyon endonükleaz profilinin belirlenmesi, enterokokal suşların ayırt edilmesinde olağanüstü yararlar sağlamaktadır. Multilokus Enzim Elektrofrez (MLEE), ribotipleme ve Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) veya Repetitive Extragenic Palindromic Sequence Based Method (rep-PCR) gibi PCR'a dayalı tipleme metotları da enterokok suşları arasındaki genetik ilişkinin araştırılmasında kullanılmaktadır. PCR ürünlerinin dizilenmesi veya Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP) ile incelenmesi de enterokoklardaki spesifik direnç genleri arasındaki farklılıkları göstermede ve izlemede kullanılabilen yöntemlerdir. Pek çok araştırmanın sonuçlarına göre; genomik DNA'nın SmaI enzimi ile kesildiği PFGE, suşların ayırımında belirgin avantajlar sağlayan oldukça yararlı bir yöntemdir. Halen PFGE en yararlı ve en güvenilir tek tipleme metodudur ve enterokokal enfeksiyonların epidemiyolojik incelenmesinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (3,111-115).

2.12.1. Fenotipik tipleme metotları

2.12.1.1. Biyotipleme

Biyotipleme mikroorganizmanın metabolik ve fizyolojik karakterlerini baz alır. Bu bağlamda enerji metabolizması, karbonhidrat kullanımı ve farklı enzimatik aktiviteleri ölçen test yöntemleri kullanılır. Elde edilen bulgular mikroorganizmanın genel

morfolojik özellikleri ile birlikte sıklıkla otomatize edilmiş bir nümerik değerlendirme sistemi içerisinde sorgulanır. En çok kullanılan test sistemleri API 20 Strep, API 50 CH ve Rapid ID 32 Strep'dir. Ayrıca eskulinaz ve piraz aktivitesi apizym testi ile değerlendirilebilir. PhenePlatek PhP plate (PhPlate Microplate Techniques, Stockholm, Sweden) enterokokların epidemiyolojik özelliklerinin araştırmasında önemlidir ve PFGE ile elde edilen epidemiyolojik gruplar ile benzer gruplar verir (111).

2.12.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Protein fingerprinting

Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri baz alan nümerik biyotiplemenin zaman alıcı ve düşük ayırım gücüne sahip olması sebebi ile daha hızlı, güvenilir ve yüksek ayırım gücüne sahip tiplendirme yapabilen fenotipik özelliklere dayalı alternatif tiplendirme metodları içerisinde, hücre duvarı veya tüm hücre proteinlerinin mobil bir matriksde elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre göç ettirilerek ayrıştırılmalarını esas alan SDS-PAGE yöntemi, sık olarak kullanılmış, bu yöntemle çok sayıda suşun hızlı şekilde taranmasını sağlamış ve tür ve/veya alttür seviyesinde güvenilir sonuçlar elde edilebilmiştir.

Poliakrilamid gelde elde edilen protein profillerinin bakterinin eksprese ettiği proteinler için parmak izi olarak dikkate alındığı bu yöntem diğer sınıflandırma şemaları ile kombine edilerek, bilinmeyen izolatların tanımlanması amacı ile kullanılabilir. Son çalışmalarda elde edilen sonuçlar, mikroorganizmaların protein parmak izi ile DNA-DNA homoloji değerleri arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu göstermiştir (116).

2.12.1.3. Multi-Lokus Enzim Elektroforezi (MLEE)

Multilokus enzim elektroforezis yöntemi, ökaryotik canlıların populasyon genetiği ve sınıflandırılmasında uzun bir süreden beri kullanılmakta olan standardize edilmiş bir metoddur. Son 20 yıldır da giderek artan yoğunlukta bakteriyel evrim ve sınıflandırmanın anlaşılabilmesi için kullanılmaya başlamıştır. MLEE'nin sınıflandırma ve epidemiyolojik ilişkiyi tespiti yönelik diğer fenotipik yöntemlerden farkı, allel profillerinin tamamını elektroforetik tip olarak verebilmesidir. Bu yöntem hücre içi

enzimlerin elektroforetik hareket yeteneğine göre karakterize edilmesini esas alır ve organizmaları oluşturdıkları elektromorfo tiplerine göre diğerlerinden ayırır. Bu elektroforetik tiplerden popülasyon karakterizasyonu için objektif bir databaz oluşturulabilir. Genellikle, MLEE ile 20 kadar housekeeping enzimde doğal olarak yüksek değişkenlik gösteren lokuslar hedef alınır, bu sebeple teknik monolokus enzim elektroforezinden çok daha yüksek ayırım gücüne sahiptir (111, 117).

2.12.1.4. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Bu tiplendirme standart bir dizi antibiyotiğe karşı farklı izolatların duyarlılık kalıplarının karşılaştırılması esasına dayanır. Farklı duyarlılık kalıbı veren izolatlar epidemiyolojik köken olarak farklı suşlar olarak kabul edilirler. Farklı hastaların klinik örneklerinden izole edilen suşlar arasında yeni veya alışılmışın dışında bir antibiyotik duyarlılık kalıbı ile karşılaşılması halinde o suş yeni bir salgının habercisi olarak değerlendirilir. Bu yöntemle düşük sensitivitede de olsa bütün izolatlar tiplendirilebilir. Yöntem rutin uygulanan bir işleme dayandığı için fazla tecrübeyi gerektirmeyen kolay bir tekniktir. Bu sebeple enterokokların sebep olduğu enfeksiyonların epidemiyolojisinde başarılı bir ayırt edici test sistemi olarak kullanılmıştır.

Enterokoklarda, bazı antibiyotiklere karşı görülen intrinsik direncin yanı sıra, konjugatif plazmidlerde veya transpozonlarda kodlanan çok sayıdaki mekanizma ile çok sayıdaki antibiyotiğe karşı direnç görülür. Benzer direnç genlerine sahip enterokok türleri hayvan atıkları, gıda örnekleri ve çevresel örneklerde de görülebildiği için antibiyotik direnç kalıpları, enterokok izolatlarının kaynak tespitinde yani epidemiyolojik izlemde sınırlı öneme sahiptir. Hastane kökenli enterokoklarda, 1980'li yılların sonlarına kadar yüksek düzeyli gentamisin direncinin yanı sıra ampisilin direnci görülürken, son 20 yılda bu gruba %30'lara ulaşan vankomisin veya glikopeptid direncide eklenmiştir. Enterokok suşlarının antibiyotik kalıplarının çıkartılması bir taraftan düşük ayırım gücüne sahip epidemiyolojik sonuçlar yaratırken, direncin engellenmesi, yeni antibiyotiklere karşı direnç trendinin takibi ve özellikle tedavileri problemlili olan *VanC*'ye sahip enterokokların izlenmesi açısından önemlidir. Bu tekniğin en belirgin dezavantajı; aynı antibiyotiğe farklı genetik mekanizmalarla direnç geliştiren izolatları birbirinden ayırt edememesidir. Bu epidemiyolojik izlemde ayırım gücünü düşürür. Belirli bir zaman

dilimi içerisinde aynı suşun farklı izolatları bir veya birden fazla farklı antibiyotiğe karşı farklı direnç kalıbı verebilirler (111, 118).

2.12.1.5. Serotipleme

Enterokoklar opsonizan antikorların hedefi olan kapsüler polisakkarid antijenlere sahiptir. Lancefield R.(1933) streptokokları C polisakkarit antijenlerine göre yaptığı sınıflandırmada, enterokoklarda ortak kapsüler polisakkaridi tanımlayarak, bu grup antijenini D grubu olarak tanımlamıştır. Enterokoklarda kapsüler polisakkarid antijen, 6-alfa-D-glucose-1-2-glycerol-3-PO₄'ın tekrarlayan ünitelerinden oluşan, glycerolteichoic asit benzeri bir yapı gösterir. Bu yapıda glikoz molekülüne bağlı alfa1,2 ile karbon 2 atomları yer değiştirmiştir. Hidrojen klorür veya formalin ile elde edilmiş kapsül polisakkaritlerine karşı tavşanlardan elde edilen opsonizan antiserumlar kullanılarak yapılan subtip çalışmalarında iki farklı şemada 24 ve 21 serotip tespit edilmiştir (90, 91). Ancak Sharpe tarafından yapılan antijenik sınıflandırmada bildirilen serotiplerden sadece 9'unun gerçek enterokok olduğu belirlenmiş ve 21 serotipli şemanın daha gerçekçi olduğu, bu şema ile izolatların %76'nın üzerinde bir oranda tiplendirilebildiği vurgulanmıştır (119-121).

Enterokokların fenotipik identifikasyonu ve tiplendirilmesinde bu yöntemlerin dışında bir çok araştırmacı tarafından bakterinin, uzun zincirli yağ asitleri, hücre membranı yağ asitlerinin metil ester analizi, enterosin analizi, hücre membranının pyrolizin ekstraksiyonunun mass spektro ile analizi, Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve Proton manyetik rezonans spektroskopisi (1H MRS) gibi çeşitli yöntemler denenmiş, sınırlı kullanım alanı bulan bu yöntemlerden bazılarının PFGE'ine yakın ayırım gücü gösterdiği bildirilmiştir (111).

2.12.2. Genotipik tiplendirme metotları

Enterokok izolatlarının hızlı identifikasyonu ve tiplendirilmesinde, son araştırmalar moleküler biyoloji tekniklere odaklanmıştır. Enterokoklara bağlı salgın epidemiyolojisinde kullanılan moleküler tiplendirme metotları Willey ve ark tarafından 1994 yılında toparlanmıştır. Kromozomal DNA'nın G+C içeriği ve DNA-DNA hibridizasyon deneyleri gibi bakteri sınıflamasındaki ana teknikler sıklıkla yeni izole

edilerek tanımlanan suşların karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Genomda spesifik bölgelerin in-vitro şartlarda amplifikasyonu, amplifiye ürünlerdeki spesifik mutasyonların restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşturdukları bantların polimorfizmi ve nihayet toplam genomun spesifik şartlarda bir restriksiyon enzimi ile hazmı sonunda oluşan bant kalıplarının polimorfizminin analizi enterokokların sebep oldukları salgınların analizinde salgın suşlarının klonal düzeyde tanımlanması için kullanılmıştır.

2.12.2.1. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) Bazlı Yöntemler

Enterokokların kromozomal restriksiyon analizinde, mikroorganizmalardan izole edilen DNA uygun restriksiyon enzimlerinden bir veya bir kaç ile kesilmesi sonucu elde edilen DNA fragmanları agaroz jel elektroforezi ile bant büyüklüklerine göre ayrıştırılır. Elde edilen bant paternlerinin polimorfizmine göre tiplendirme yapılır. Savor ve ark. 1998 yılında klinik örneklerden izole edilen *E. faecium*'ları REA ve PFGE yöntemleri ile incelemiş ancak her iki yönteminde ideal olmadığını bildirmişlerdir (122).

a.Plazmid DNA profil analizi: Plazmid DNA'sı ekstrakte edildikten sonra ya REA veya PFGE gibi spesifik bir enzimle hidrolize edildikten sonra agaroz gelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılır. Bant polimorfizmi tiplendirme amacı ile kullanılır. Ancak yöntemin önemli dezavantajları bulunmaktadır. Mesela plazmidler fermentasyon ve diğer teknolojik işlemler sırasında kaybolabilir veya konjugatif transfer ile rearrangementa uğrayabilir.

b.Pulsed Field Gel elektroforezi (PFGE): Pulsed field jel elektroforez yöntemi ile REA'de olduğu gibi genomdaki bilinen spesifik bir bölgenin amplifikasyonu sonucu elde edilen nispeten kısa ampikonların değil, total genomun bir restriksiyon enzimi ile hazmı sonucu ortaya çıkan bant polimorfizmi değerlendirilir. Büyük genomdan elde edilecek bantlarında bir kısmının oldukça büyük olacağı varsayımından hareketle bu yöntemde PCR-RFLP'den farklı elektroforez şartları kullanılır. Tek yönlü düzenli elektrik akımı altında DNAfragmentlerinin moleküler büyüklüklerine göre yürütülerek ayrıştırıldığı geleneksel jel elektroforezinde 50 kb'dan büyük DNA molekülleri aynı mobilitayı gösterirler. Bu sebeple 50 kb'dan büyük DNA fragmentleri jel içinde geniş, ayrışmamış bantlar olarak görülürler ve standart jel elektroforezi ile ayırt edilmeleri imkansızdır. PFGE yönteminde, elektrik akım yönünün periyodik olarak değiştirilmesi ve geldeki DNA fragmentleri üzerine belirlenen aralıklarla düz akım gönderilebilmesi

sonucu, 50kb'dan daha büyük DNA molekülleri bile kolaylıkla ayrıştırılabilmekte ve genomun tamamını değerlendirmek mümkün olmaktadır. PFGE yönteminde bakteriyel enzimlerin spontan degradasyonundan korumak amacı ile agaroz jel içine gömülü haldeki bakteriden, bütünlüğü bozulmadan izole edilen DNA, yine jel içerisinde iken bilinen 5-6 baz uzunluğunda tanıma bölgesine sahip bir restriksiyon enzimi hidrolize uğratarak kesilir. Agaroz jel içerisinde elde edilen DNA fragmentleri akım yönü ve şiddeti belirli aralıklarla değiştirilerek elektroforeze tabii tutulur. Elektroforez sonrası jelin Ethidium bromid ile boyaması sonrası jeldeki DNA fragmentleri ultraviyole ışıkta görüntülenmekte ve elde edilen bant polimorfizmi gözle veya bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilmektedir. PFGE ile elde edilen bant paternlerine göre hem kromozomal DNA'nın büyüklüğü tahmin edilebilmekte, hem de suşların klonal olarak ilişkilendirilmeleri mümkün olmaktadır. PFGE oldukça yüksek ayırım gücü olan, sonuçları tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir bir yöntem olduğu için genotipik identifikasyonda, özellikle hastane enfeksiyonlarının süzveyansında referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Yöntemin en önemli dezavantajları pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması, zaman alıcı oluşu ve hala pek çok tür için standart protokollerin oluşturulamamış olmasıdır (3,111-114).

c.Ribotipleme: Son yıllarda epidemiyolojik süzveyans amacı ile mikroorganizmalarda 16S, 23S ve 5S rRNA genleri arasında bulunan spacer bölgelerdeki heterojeniteyi hedef alan nükleik asit amplifikasyonuna dayalı teknikler denenmiştir. PCR-Ribotipleme yöntemi ile rRNA operonunda cins ve tür düzeyinde farklı büyüklüğe sahip çok sayıda spacer bölgeleri hedef alınır. Bu yüzden belirli bir suşta farklı büyüklükte spacer bölgeleri bulunduğundan çok sayıda bant elde edilir. Bu teknik *E. faecium*, Enterobakterler ve *Listeria monocytogenes* izolatlarının tiplemesinde kullanılmaktadır. *E. faecium* suşlarının PCR-ribotipleme ile analizinin, bu bakteri türünde en az dört sınıf intergenik spacer bulunduğu için, yararlı olmadığı sonucuna varılmıştır (123).

2.12.2.2. Nükleik Asit Amplifikasyonu Bazlı (NAAB) Teknikler

Mutasyonların belirlenmesi için, mikroorganizmaların spesifik gen bölgeleri ile direnç genleri gibi bilinen gen bölgelerinin amplifikasyonuna dayalı tekniklerdir.

a.PCR Bazlı teknikler: Bütün mikroorganizmalarda olduğu gibi enterokokların tür, suş ve genotip tayininde başarı ile kullanım alanı bulmuştur. Bu amaçla enterokoklardaki

“elongasyon faktör *tuf* genini (EF-Tu) hedef alan primerler, cins düzeyinde, D-alanin/ D-ligaz geni (*ddl*) ve *groESL* genini hedef alan primerler de tür düzeyinde tanı amacı ile kullanılmıştır (111). Kniff ve arkadaşları tarafından (2001) *ddl* genini hedef alan tür spesifik primerler *E. durans* ve *E. hirae* için onaylanmıştır (124). PCR bazlı metodlar antibiyotik direncinin tespiti için de uygulanmış, böylece bir taraftan hızlı duyarlılık testi yapılırken diğer taraftan izole edilen suşlar arasında vertikal yayılan direnç genleri veya gen mutasyonları sebebi ile klonal ilişkide gösterilebilmiştir. *ddl* genini hedef alan primerler ile tür düzeyinde tanı yanı sıra glikopeptid direncinin tespitini de yapabilmek mümkün olmuştur (125). Daha sonra *van* genleri için bir primer seti geliştirmiş flöresana dayalı PCR sistemi LightCycler’da kullanılmıştır (111). Daha sonra enterokokların tanısında ve epidemiyolojik sürveyansında kullanılmak üzere, çok sayıdaki araştırmacı tarafından, enterokokların 16S rRNA’sını hedef alan primerlerle tür tayini ile eş zamanlı olarak *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *C2* ve *C3* genlerini alan primerlerin kullanıldığı, glikopeptid direncinin tespitine yönelik multipleks PCR protokolleri geliştirilmiştir (125, 126). Ayrıca enterokokların virulans genlerini hedef alan PCR teknikleri geliştirilmiştir (127).

b.Random Amplified Polimorphic DNA-PCR(RAPD-PCR)/ Arbitrarily primed-PCR (AP-PCR): Random primerler kullanılarak DNA polimorfizminin gösterilmesine dayalı metottur. Düşük annealing ısısında, yüksek Mg⁺ konsantrasyonunda random düzenlenmiş kısa primerlerin bakteri DNA’sına rastgele bağlanması ile oluşan primer-DNA hibridlerinin amplifikasyonu sonucu oluşan DNA fragmentlerinin polimorfizmini hedef alan PCR bazlı bir yöntemdir. RAPD metodu, iki yerine tek primer kullanımı ve bağlanma ısısının düşük olması açısından klasik PCR’dan farklıdır. RAPD-PCR’ın klinik örnekler ve gıda örneklerinden izole edilen enterokokların tanımlanması ve ayrılmasında güvenilir bir teknik olduğu ileri sürülmüştür (111). Hastane kökenli VRE’lerin epidemiyolojik sürveyansında hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu ancak yüksek düzeyde aminoglikozid direnci (HLAR) gösteren enterokokların tiplmesinde tekrarlanabilirliğinin düşük olduğu bildirilmiştir (128). Bazı çalışmalarda RAPD ve PFGE yöntemlerinin sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu gösterilmiştir (123). Arbitrarily Primed Amplification (AP-PCR) kullanarak *E. durans*, *E. hirae* ve *E.villorum*’un bütün suşlarını bant paternlerindeki farklılıklara göre gruplanmıştır (129).

c.Spesifik ve Random Amplifikasyon-PCR: SARA-PCR: Tek bir reaksiyonda enterokok türlerinin tanımlanması ve *vanA* geninin gösterilmesini sağlayan bir

yöntemdir. Teknik *vanA* primer seti kullanımına dayalıdır. *vanA* geni bulunan suşlarda yaklaşık 700bp lik bant ile birlikte kompleks paternler oluşur (111).

d.Amplified fragment length polymorphism (AFLP): Bu yöntem total genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile açık uçlu olarak kesilmesi sonrasında açığa çıkan DNA fragmentlerinin, ligaz enzimleri yardımı ile açık uçla uyumlu oligonükleotit adaptörleri ile ligasyonunu ve ligasyonla yerleştirilen oligoları hedef alan primerler kullanılarak amplifikasyonlarını hedef alan bir yöntemdir. Klasik PCR yöntemlerinde olduğu gibi amplikonların polimorfizmi, agaroz jelde veya kapiller elektroforezle tanımlanır. AFLP ve PFGE karşılaştırıldığında bu iki tekniğin iyi bir uyum gösterdiğini bulunmuştur (130). AFLP yönteminin VRE'ler için PFGE'ye kıyasla uyumsuz olduğunu bildiren sonuçlar da vardır (131).

e.Repetitive Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rep-PCR): Repetitive-PCR metodu bakteriyel genomda dağılmış olarak bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin kopyalarının PCR ile gösterimine dayalıdır. Bu tekrarlayan DNA elementleri cins ve türlere göre değişmek üzere genomda farklı uzaklıklar da yerleşmiştir. Bu tekrarlayan elementleri hedef alan primerlerin kullanıldığı amplifikasyon sonucunda değişik uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentlerin polimorfizmi spesifik DNA fingerprinting-parmak izi olarak değerlendirilir (111, 132).

f.İntergenik rRNA spacer bölgeleri-PCR (ITS-PCR): Enterokok türleri için spesifik olan, 16S ve 23S rRNA arasında yer alan intergenik spacer bölgesini hedef alan primerlerin kullanıldığı bir amplifikasyon yöntemidir (111). Amplikonlar yüksek rezolüsyonlu % 6 non-denatüre akrilamid-bisakrilamid jel elektroforezi ile incelenmiştir. Bu metotla incelenen *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. faecalis* ve *E. hirae* benzer profil göstermiştir. Daha ayırt edici sonuçlar elde edebilmek için amplikon Sau3A1 restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve ortaya çıkan fragment polimorfizmi ile *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans* ve *E. hirae* birbirinden ayırt edilebilirken *E. gallinarum* için spesifik polimorfizm tespit edilememiştir (133).

g.Diğer Amplifikasyon Bazlı yöntemler: Çeşitli klinik ve çevresel örneklerden izole edilen enterokokların cins, tür ve suş düzeyinde tanımlanması amacı ile bakteri genomundaki spesifik bölgeleri hedef alan çeşitli amplifikasyon bazlı modifikasyonlar kullanılmıştır. Bunlar arasında; 16S rDNA genini çevreleyen fragmanları hedef alan, "Amplified ribozomal DNA Restriction Analyse (ARDRA)" yöntemi, PCR-

Ribotipleme, SDS-PAGE ve 16S rDNA dizi analizinin kombinasyonu olan “PCR-amplified 16S rDNA- RFLP” yöntemi, groESL geninin spesifik primerlerle amplifikasyonu sonucu oluşan ampikonun HaeIII ve RsaI ile hazmı sonucu oluşan band polimorfizmini hedef alan “Broad range PCR-RFLP” yöntemi, özellikle klinik olarak önemli enterokok türlerinin tanımlanmasında yararlı olduğu ileri sürülen, DNA dizisinde tek nükleotit farklılığını Tm ısı farklılığı ile ortaya koyan “Temporal temperature gradient gel elektroforezi” yöntemi, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının ayırımında başarı ile uygulanan “Denaturing Gradient jel elektroforezi” yöntemi, insan ve hayvan orijinli enterokokal türlerin ayırımında denenmiş olan “tRNA-intergenik length polimorfizm analizi” yöntemi, özellikle 16S rRNA ve 23S rRNA genleri olmak üzere ITS bölgeleri, Chaperonin 60 (Cpn60) geni, *groES* ve *groEL* genlerini, *vanA*, *vanB*, *vanC* ve *vanD* genini ve nihayet yüksek düzeyde glikopeptid direnci (HLGR) genlerini hedef alan problemlerin kullanıldığı “Nükleik asit Hibridizasyon” yöntemi, *vanA* ve *vanB* genlerini hedefleyen primerlerin kullanıldığı, spesifik mRNA yı gösteren Reverse Transkriptaz- PCR (RT-PCR) yöntemi kullanım alanı bulan önemli yöntemlerdir (111).

2.12.3. Dizi analizi yöntemleri

Diğer birçok mikroorganizmada özellikle tek nokta mutasyonlarına dayalı bilinen veya bilinmeyen farklılıkları tespitiye yönelik olarak kullanılan ve epidemiyolojik metodlar içerisinde en yüksek ayırım gücüne sahip olan dizi analizi yöntemi enterokok izolatlarının cins ve tür ayırımının yanı sıra izolatların klonal ilişkilerinin tespitinde de kullanılmıştır.

a.Parsiyel Dizi Analizi: 16S rDNA V4 ve V9 bölgelerine yönelik PCR analizini takiben yapılan parsiyel dizi analizi, enterokokların identifikasyonu ve sınıflamasında güvenilir bir tekniktir. VRE’lerin identifikasyonunda da multipleks PCR ile kombine olarak bu yöntem kullanılmıştır. Bu gen bölgesi dışında izolatların identifikasyonu için; *ddl* geni, *cpn60* geni, *groES* geni, *sodA* genlerinde dizi analizi yapılmış ve özellikle *sodA* geninin dizi analizinin 16SrRNA geni dizi analizine göre daha diskriminatif olduğu ileri sürülmüştür (134).

b.Multilokus Sequence Tipleme (MLST): Pekçok bakteriyel türün virulans faktörlerinin ve moleküler epidemiyolojik özelliklerin değerlendirilmesinde

kullanılmıştır. Housekeeping genlerin internal parçalarının DNA dizisindeki allelleri tanımlama dayalı bir yöntemdir. Enterokoklarda MLST'nin, özellikle *E. faecium* suşlarının, uluslararası veri bankasını oluşturmada uygun bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır (135).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın yapılabilmesi için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 12/2010-11 kararınca etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmamıza Eylül 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hemodiyaliz Ara Yoğun Bakım Ünitesi ve nefroloji servisinde kronik böbrek yetmezliği tanısıyla yatmakta olan hastaların rektal sürüntü örneklerinden ve çevre kültürleri (etejerler, hasta yatakları, musluk, telefon, odanın zemini, monitör, tansiyon aleti, kapı kolu) yapılarak, vankomisin rezistan enterokok olarak izole edilen suşlar dahil edildi. Örnek alımı sırasında hastaların yaşı, cinsiyeti, yatışın kaçınıcı gün olduğu, herhangi bir antibiyotik kullanıp kullanmadığı, fistül olup olmadığı, diyalize girip girmediği, diyalize hafta da kaç kez girdiği, hemodiyaliz katateri olup olmadığı, periton diyalizi yapılıp yapılmadığı sorgulandı. Klinik örnekler tarafımızca alındı. Nefroloji servisi 25 yataklı hastanemizin 2. katında güney cephede, HAYBÜ 6 yataklı hastanemizin bodrum katında kuzey cephesinde, Hemodiyaliz Ünitesi ise HAYBÜ ile yan yana bulunmaktadır.

İzole edilen suşların identifikasyon ve vankomisin MİK değerinin belirlenmesinin ardından rep-PCR ile genotiplendirilmesi yapıldı.

3.1. Örneklerin Toplanması

HAYBÜ ve nefroloji servisinde kronik böbrek yetmezliği tanısıyla yatmakta olan hastalardan rektal sürüntü örnekleri alındı. Eş zamanlı olarak hastalara ait olan etejerler, hasta yatakları, odanın zemini, musluk başı, kapı kolu, telefon, monitör, tansiyon aleti, klozet gibi cansız yüzeylerden Stuart (Oxoid, İngiltere) taşıma besiyeri ile sürüntü kültürleri alındı. Sürüntü örnekleri alınırken, pamuklu silgiçler yağ asitlerinin sebep olabileceği inhibitör etkiyi ortadan kaldırmak için steril serum fizyolojik ile ıslatıldı.

3.2. Bakterilerin Tanımlanması

Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen rektal sürüntüler ve cansız yüzeylerden alınan sürüntü örnekleri koyun kanlı agar (bioMerieux, Fransa) besiyerlerine ekildi. Ekim yapılan plaklar 37 °C’de 24-48 saat inkübe edildi. Üreyen bakterilerin tanımlanması aşamasına geçildi.

3.2.1. Konvansiyonel Yöntemler

Kanlı besiyerinde 0.5-1.5 mm boyutunda, kabarık, gri-beyaz renkte, küçük nonhemolitik veya alfa hemolizli, katalaz negatif, hareketsiz, mikroskopik olarak Gram pozitif kok şeklinde görünen bakterilerin enterokok olabileceği düşünülerek pasaj yapılarak saf kültürleri elde edildi. PYR testi, safra eskulin testi, % 6.5’lik NaCl’de üreme özellikleri incelenerek *Enterococcus* spp. tanısı kondu. Cins düzeyinde tanımlama otomatize bir sistemle yapıldı. Tüm suşların CLSI standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemiyle vakomisin duyarlılığına bakıldı. Dirençli olarak saptanan suşların E test ile MİK değeri belirlendi.

3.2.1.1. Katalaz testi

Enterokok olduğu düşünülen koloniden lam üzerine konularak üzerine % 3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Hızla moleküler oksijen üretimi sonucu damlatır damlatmaz hava kabarcığının oluşması pozitif test olarak kabul edilir. Katalaz testi negatif olan suşlar değerlendirmeye alındı.

3.2.1.2. Safra-eskulin testi

Bu test belirli bazı bakterilerinin (enterokoklar ve D grubu streptokoklar) eskulini % 40 safra tuzlu ortamda hidrolize etmesi temeline dayanır. Eskulinin safırlı ortamda hidrolizi glikoz ve eskuletinin açığa çıkmasına yol açar. Eskuletin zamanla besiyerindeki ferrik iyonlarla reaksiyona girerek siyah diffüz bir kompleks oluşturur.

Bu test için hazır olarak temin edilen Bile-Eskulin-Agar (Difco) kullanıldı. Bu besiyerine şüpheli koloniden ekim yapıldı. 35°C’de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda

besiyerinde üreyen ve eskulini hidrolize ederek siyah renk oluşturan suşlar pozitif kabul edildi.

3.2.1.3. % 6.5'lik NaCl'de üreme testi

Mueller Hinton agar (difco) besiyerine %6.5'lik NaCl eklenerek besiyeri hazırlandı. Şüpheli koloniden öze ile besiyeri içerisine ekim yapılarak 35 °C de 24-72 saat inkübe edildi. Besiyeri içerisinde bulanıklık oluşturan suşlar pozitif kabul edildi.

3.2.1.4. PYR testi

Bu testte L-onidonyl-betanaphtylamide substratı kullanılmaktadır. Bu substrat spesifik bakteriyel aminopeptidaz enzimiyle hidrolize edilir. Sonuçta serbest beta naftilamid açığa çıkar ve bu son ürün N, N dimetil aminocinnamaldehit eklenmesiyle tesbit edilir. Oluşan pembe-kırmızı renk pozitif reaksiyonu gösterir.

Testte hazır olarak temin edilen (Oxoid)) substrat emdirilmiş filtre kağıdı üzerine şüpheli koloniden 2-3 adet konularak buffer solüsyonu eklendi ve 5 dakika beklendi. Ardından % 0.015 p-dimetyl-aminocinnamaldehyde içeren ayıraç 1-2 damla damlatılıp 30-60 dk beklendi. Pembe-kırmızı renk değişimi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.2.2. Otomatize identifikasyon yöntemi

Konvansiyonel yöntemlerle enterokok olduğu düşünülen bakteriler Vitek 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize bakteri identifikasyon sistemi ile tanımlandı. Bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bunun için, Vitek Densicheck (bioMerieux) dansitometri kullanıldı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları Gram pozitif tanımlama kartlarına (GP-ID) önerilen şekilde dağıtıldı ve cihaza yerleştirildi.

Vitek 2 cihazı tam otomatik bir bakteri tanımlama ve mikrodilüsyon prensibine göre antibiyotik duyarlılık testleri yapılmasını sağlayan bir sistemdir. Boyu 5.5 cm, eni 9 cm boyutlarında, üzerine 64 adet kuyucuk ve her kuyuda, liyofilize yapıda, bir metabolit veya farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren özel plastik kartlar şeklindedir.

Bakteri inokulumunun vakum prensibine dayalı bir dağıtıcı ile dağıtılmasının ardından, her bir kuyucuk mikrolitre boyutunda doldurulmuş olur. Bu kartlarda barkodlama sistemi ile seviyelendirilmiş ve cihaza girmeden önce kartları alıp tanımlayan “smart taşıyıcı” bilgisayar çipi kullanılmaktadır. Kartlar dolmuş yerinden okuyucu inkübatöre taşınır ve testin sonunda otomatik olarak bir atık kutusuna atılmaktadır.

3.3. Duyarlılık Testleri

3.3.1. Disk difüzyon testi

Bakterilerin antibiyotiklere karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak (M02, M07 dökümanı) çalışıldı. Mueller Hinton agar (Difco) besiyerine taze bakteri kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu dağıtıldı. Üzerine 30 µg vankomisin içeren antibiyotik diski (Oxoid) yerleştirildi. 35±2 °C’de 24 saat inkübe edildi. Zon çapı ≤ 14 mm olan sonuçlar dirençli olarak kabul edildi.

3.3.2. E Test (AB Biodisk)

Difüzyon prensibine dayanan, ancak diskler yerine plastik stripler üzerinde bulunan antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği bir duyarlılık yöntemidir. Stripin bir tarafında ilaç, belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde ve kurutulmuş olarak bulunur. Diğer yüzünde de antimikrobiyal ajanın stripin ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmıştır. 0.5 McFarland bakteri inokulumu, disk difüzyon yöntemindekine benzer olarak Mueller Hinton agar besiyerine dağıtıldı ve üzerine E test stripleri yerleştirildi. 35±2 °C’de 24 saat inkübe edildi. Elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. MİK değeri 8-16 µg/mL bulunanlar intermediate, ≥32 µg/mL olanlar dirençli olarak kabul edildi.

E Test stripleri AB Biodisk firmasından temin edildi ve üretici firmanın önerisiyle –20 °C’de saklanarak, kullanmadan 30 dakika önce çıkarılıp oda sıcaklığına ulaşması sağlandı.

Vankomisine dirençli olarak bulunan enterokok suşları % 4 gliserollü, brain-heart infüzyon agarda üretilerek, -20 °C’de genomik analiz yapılana dek muhafaza edildi.

3.4. Kökenlerin Genotiplenmesi için Moleküler Yöntem

Vankomisine dirençli olarak bulunan enterokok suşlarının genotipik analizi otomatize bir sistem olan DiversiLab (bioMerieux) cihazında çalışıldı. DiversiLab, rep-PCR teknolojisi kullanılarak standardize ve tekrarlanabilir DNA parmak izi profilleri ile kısa bir sürede suşların genotiplendirmesini yapan, otomatik bir PCR cihazıdır. Cihaz ve adapte edildiği kit, ticari bir kit olduğundan (patentli ürün) ilgili firma ve kit kullanım kılavuzundan vankomisine rezistan enterokok genomik analizi için araştırılan gen bölgesine ulaşılamamıştır.

Bu çalışma 4 aşamada yapıldı.

1. Vankomisine rezistan enterokok saf kültüründen manuel DNA ekstraksiyonu yapıldı.
2. Thermalcycler’da DiversiLab parmak izi kitleri kullanılarak rep-PCR yapıldı.
3. Bioanalizör kullanılarak otomatik microfluidic elektroforez yapıldı.
4. İnternet tabanlı yorumlama yazılım programı ile kolay ve hızlı değerlendirme yapıldı. DNA ekstraksiyonu yapmak için -20 °C’de muhafaza etmiş olduğumuz bakteri suşlarını bir gece etüvde beklettikten sonra koyun kanlı agara ekilerek suş canlandırıldı.

3.4.1. DNA ekstraksiyonu için yapılan aşamalar

Ekstraksiyon kitinin içeriği

- ❖ Kumlu tüp
 - ❖ 2 mL’lik ependorf tüp
 - ❖ Kolonlu tüp
 - ❖ MD1, MD2, MD3; MD4, MD5 Solusyonu
1. 300 µl MicroBead çözeltisi, her biri içerisinde kum tanesi bulunan MicroBead tüpüne dağıtıldı.
 2. Besiyerinden numune alındı (1 defa 10 µl öze).
 3. MicroBead tüpündeki sıvı içerisine alınan enterokok kolonileri öze ile iyice karıştırıldı.
 4. 50 µl MD1 çözeltisi eklendi.

5. 10 dakika boyunca 2400 rpm'de vortekslendi.
6. 30 saniye 10.000 g'de çevrildi.
7. 100 µl MD2 çözeltisi temiz ependorf tüplerine boşaltıldı.
8. Tüm süpernatantı (6. adımdan) 100 µl MD2 çözeltisine (içerisinde kum tanesi olmamasına dikkat edilerek) aktarıldı.
9. Kısa bir süre vortekslendi.
10. 15 dakika +4 °C'de soğutuldu.
11. 1 dakika 10.000 g'de çevrildi.
12. 450 µl MD3 çözeltisi temiz ependorf tüplere boşaltıldı.
13. 200 µl süpernatant (11. adımdan) 450 µl MD3 çözeltisine aktarıldı.
14. Kısa bir süre vortekslendi (40-50 saniye).
15. Kısa bir süre santrifüj edildi (1 dakika kadar).
16. Süpernatant (15. adımdan, 650 µl) temiz bir spin filtreye transfer edildi.
17. 30 saniye 10.000 g'de çevrildi ve aşağı akan sıvı atıldı.
18. 300 µl MD4 çözeltisi spin filtreye boşaltıldı (17. adımdan).
19. 30 saniye 10.000 g'de çevrildi ve aşağı akan sıvı atıldı.
20. 1 dakika 10.000 g kuru olarak çevrildi.
21. Spin filtre yeni temiz bir tüpe yerleştirildi.
22. 35 µl MD5 çözeltisi spin filtreni tam ortasına ve filtreye dokunmadan boşaltıldı.
23. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
24. Filtre çıkarılıp atıldı.
25. DNA toplama tüpünde tutuldu.
26. DNA amplifikasyon işlemi tamamlandı.

3.4.2. Thermalcycler'da diversiLab parmak-izi kiti kullanarak rep-PCR yapılması aşaması

Rep-PCR ve uygun DiversiLab DNA parmak-izi kiti kullanarak örnekler amplifiye edilir.

PCR Kitinin İçeriği

- ❖ Master Mix
- ❖ PCR Buffer
- ❖ Primer Mix

❖ Taq Polimeraz

Her çalışmada 12 enterokok suşu için enterokok-DNA amplifikasyon karışımı hazırlandı.

12 hasta için	Total volüm (µl)
Rep-PCR MM	234
GeneAmp 10X PCR buffer	32.5
Primer Mix	26
AmpliTaq DNA Polymeras	6.5
	299

Testin uygulanması

1. Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir odada yapıldı. Amplifikasyon için kullanılacak buffer, master mix, primer mix, taq DNA Polimeraz -20 °C'lik derin dondurucudan çıkarıldı. Taq DNA Polimeraz çalışma anına kadar buz kalıbı üzerinde bekletildi.
2. Örnek sayısı kadar PCR amplifikasyon karışımı ependorf tüpüne hazırlandı ve 1 µl'lik ependorf tüplerine 23 µl dağıtıldı.
3. Hasta örneklerinden elde edilmiş DNA izolatlarından 2'şer µl ependorf tüplerine dağıtıldı ve kapakları kapatıldı.
4. Örneklerdeki nükleik asit 'thermal cycler' cihazında aşağıdaki siklusler uygulanarak çoğaltıldı.

Program rep-PCR45
Cycles 35

<u>Step</u>	<u>Temp (°C)</u>	<u>Time (seconds)</u>
Initial Denaturation	94	120
Denaturation	94	30
Annealing	45	30
Extension	70	90
Final Extension	70	90
Hold	4	-

5. Çalışma tamamlanınca PCR ürünleri cihazdan alındı.

6. DNA Lab Chip on Agilent Bioanalyzer cihazına yerleştirildi.

3.4.3. Bioanalizör kullanılarak otomatik mikrofluidic elektroforez yapımı

Kitin içeriği

- ❖ Chip reaktifleri
- ❖ Marker
- ❖ Jel boyası
- ❖ Jel matriksi

Testin uygulanması

1. Jel-boya içeriğinin oda ısısına getirilmesi beklendi.
2. Jel ve boya vortekslendi ve kısaca spin yapıldı.
3. 1.5 µl'lik bir tüpe 200 µl jel ve 10 µl boya konuldu.
4. Homojen olana kadar vortekslendi.
5. Kit içindeki spin filtreye (kolonlu tüp) transfer edildi.
6. 1500 g'de 10 dakika oda ısısında santrifüj edildi.

Chip'e yükleme aşaması

1. Marker ve lader kısaca vortekslendi.
2. Bu aşamada jel-boya karışımının vortekslenmesi önerilmemektedir.

3. 9 µl jel-boya karışımı çip üzerinde işaretli olan 'G' kuyucuğuna pipetlendi.
4. Çip yükleme istasyonunda şırınga 1 ml'de iken 30 saniye çipe basınç uygulandı. İstasyon kapağı açılarak piston dengeye gelene kadar beklendi.
5. Kalan G kuyularına 9 µl jel-boya karışımı pipetlendi.
6. Her bir numune kuyusuna 5 µl marker sonuna kadar pipetlendi.
7. Marker konulan kuyulara 1 µl'de bakteri DNA'sı konup pipetlendi.
8. Çip 1 dakika vortekslendi ve cihaza yüklendi.

3.4.4. 'rep-PCR DNA fingerprinting' teknoloji kullanılarak internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı ile değerlendirme yapıldı.

Tüm enterokok izolatlarının rep-PCR tabanlı parmak izi kalıpları DiversiLab sistemi ve *Enterokok* DNA parmak izi kiti kullanılarak elde edilmiştir. Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında DiversiLab yazılımı Pearson Korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pairwise grouping mathematical averaging); matematiksel ortalama ile ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması yöntemi rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanıldı. DiversiLab yazılımı içerisinde rep-PCR DNA parmak-izi veritabanı mevcuttur. Analiz sonucunda DiversiLab'ın 2.1.66 versiyonlu yazılımları kullanıldı.

Ek olarak sonuçları içeren, bilgisayar tarafından oluşturulmuş, DNA parmak izinin otomatik okunmasını gösteren dendrogram, benzer DNA dizilerinin renklerle ayrılarak gösterilen benzerlik matrisi ve suşların benzerliklerine göre grafik üzerinde noktalama yapan noktalama grafiği bilgilerin yorumlanmasında kullanıldı.

Benzerlik matrisindeki renklerden kırmızı % 100-95 oranında, turuncu % 95-90 oranında, mavi % 90-80 oranında, pembe % 80-70 oranında, gri % 70-0 oranında benzerlik olduğunu göstermektedir. Aynı suş olarak kırmızı renkte görünen yani % 100-95 oranında benzerlik gösteren suşlar kabul edildi.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.11.14 numaralı proje ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada Eylül 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi HAYBÜ ve nefroloji servisinde kronik böbrek yetmezliği tanısıyla yatmakta olan toplam 100 hastadan rektal sürüntü örnekleri ve eş zamanlı olarak hastalara ait çevre örnekleri alınarak vankomisin rezistan enterokok varlığı araştırıldı. Hastaların 51'i (% 51) kadın ve 49'u (% 49) erkek olarak bulundu. Taramalar sonucunda pozitiflik elde edilen 34 örnekten 28'i (% 82.4) hastaya, 6'sı (% 17.6) çevre örneklerine ait idi. Hastalara ait 28 pozitif örnekten 16'sı (% 57.1) kadın ve 12'si (% 42.9) erkek hastalardan izole dildi. Hastaların yaşları 18-85 arasında idi. Pozitiflik saptanan hastaların 12'sinin (% 43) 63 yaş ve üzerinde olduğu saptandı. VRE pozitif hastaların yaş gruplarına göre dağılımı Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. VRE suşlarının izole edildikleri hastaların yaş dağılımı

Yaş Aralıkları	18-29 yaş arası	30-49 yaş arası	50-85 yaş arası	Toplam
Hasta Sayısı (%)	6 (21)	10 (36)	12 (43)	28 (100)

Çalışma süresince örnek alınan hastaların 82'si (% 82) nefroloji servisinde ve 18'i (% 18) HAYBÜ'de yatmakta idi. Hastaların 28'inde VRE saptandı. Pozitiflik saptanan olgulardan 22'si (% 78.6) nefroloji servisinde ve 6'sı (% 21.4) HAYBÜ'de takip edilmekte idi. Tablo 7'de hastaların yattığı klinik birimlere göre dağılımı gösterildi.

Tablo 7. Hastaların birimlere göre dağılımı

Birimler	Nefroloji Servisi Sayı/yüzde (%)	HAYBÜ Sayı/yüzde (%)	TOPLAM Sayı/yüzde (%)
VRE pozitif	22 (26.8)	6 (33.3)	28 (28)
VRE negatif	60 (73.2)	12 (66.7)	72 (72)
TOPLAM Sayı/yüzde (%)	82 (82)	18 (18)	100 (100)

VRE açısından pozitiflik elde edilen 28 hastadan 3'ünün (% 11) tedavisinde hiçbir antibiyotik kullanılmazken, 25'inde (% 89) farklı gruplarda antibiyotik kullanımı mevcuttu. Aynı zamanda glikopeptid kullanımı incelendiğinde VRE pozitifliği saptanan 28 hastadan 8'i (% 29) vankomisin tedavisi almakta idi. VRE saptanan hastaların 12'si (% 42.9) diyalize girmezken, 11'i (% 39.3) hemodiyalize, 5'i (% 17.9) ise periton diyalizine girmekte idi.

Hastalara ve yatmakta olduğu yatağa yakın cansız yüzeylerden, nefroloji servisi ve HAYBÜ'ye ait olan ortak kullanım alanlarından her hastaya ait dokuz farklı yerden olmak üzere toplamda 900 sürüntü örneği alındı. Alınan örneklerin 6'sında VRE suşu izole edildi. Çevreden izole ettiğimiz suşların izole edildiği hastane ekipmanlarına göre dağılımı Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8. Çevre örneklerinden izole edilen VRE suşlarının dağılımı

İzole edildiği alan	İzolat sayısı
Etejer	2
Yatak	1
Klozet	2
Diyaliz sıvısı	1
TOPLAM	6

Elde edilen 34 suşun tür tayini sonucunda *E. faecium* % 85 (n:29) ile en sık karşılaşılan tür olurken *E. gallinarum* % 15 (n:5) tespit edilen diğer tür oldu (Tablo 9). Çevre kültürlerinden izole edilen 6 enterokokun tamamı *E. faecium* olarak tanımlanmıştır.

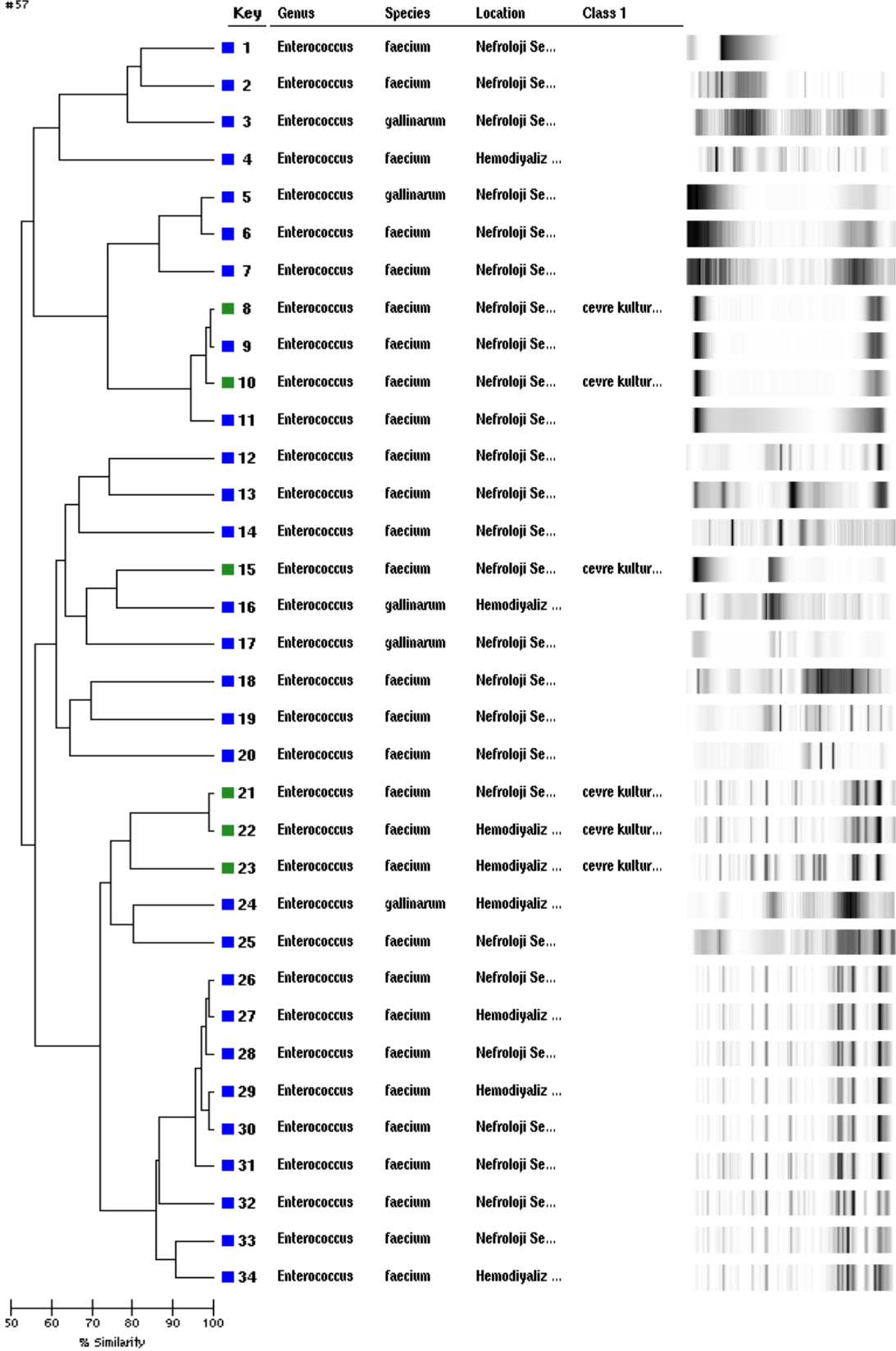
Tablo 9. VRE'lerin tür tayinine göre dağılımı

Mikroorganizma	Sayısı	Yüzde (%)
<i>E. faecium</i>	29	85
<i>E. gallinarum</i>	5	15
TOPLAM	34	100

Saptanan enterokoklar içerisinde vankomisine dirençli olanların çalışmaya dahil edilmesi planlanmışken, çalışma süresince orta düzeyde dirençli olan (MİK değeri 8-16 µg/mL) 5 örnekte *E. gallinarum* izole edilmiş ve bu bakteriler de çalışma grubuna alınmıştır.

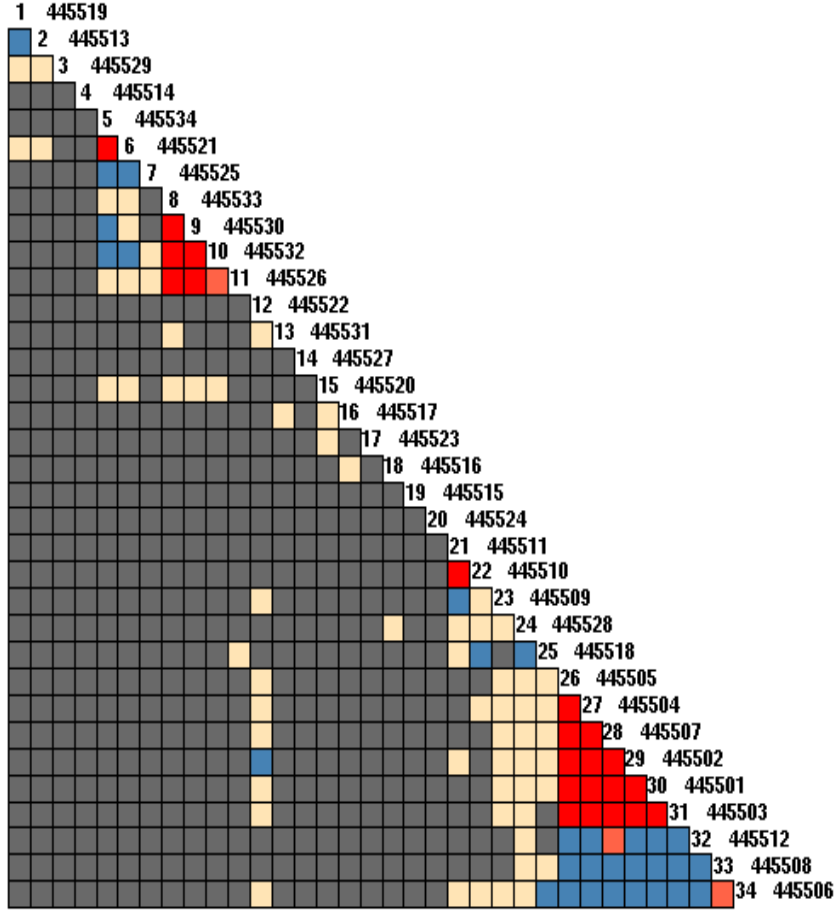
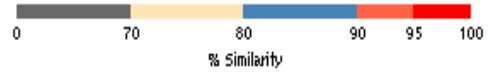
Genotipik Değerlendirme Sonuçları: DiversiLab veri analizinde bulunan dendogram, benzerlik matrisi ve noktalama grafiğine göre yorumlama yapıldı.

28 hastanın rektal sürüntü örneklerinden ve 6 çevre örneklerinden izole edilen toplam 34 örneğin DNA parmak izi sonuçlarının dendogram, benzerlik matrisi ve noktalama grafiği Şekil 2, 3 ve 4'te gösterilmiştir.

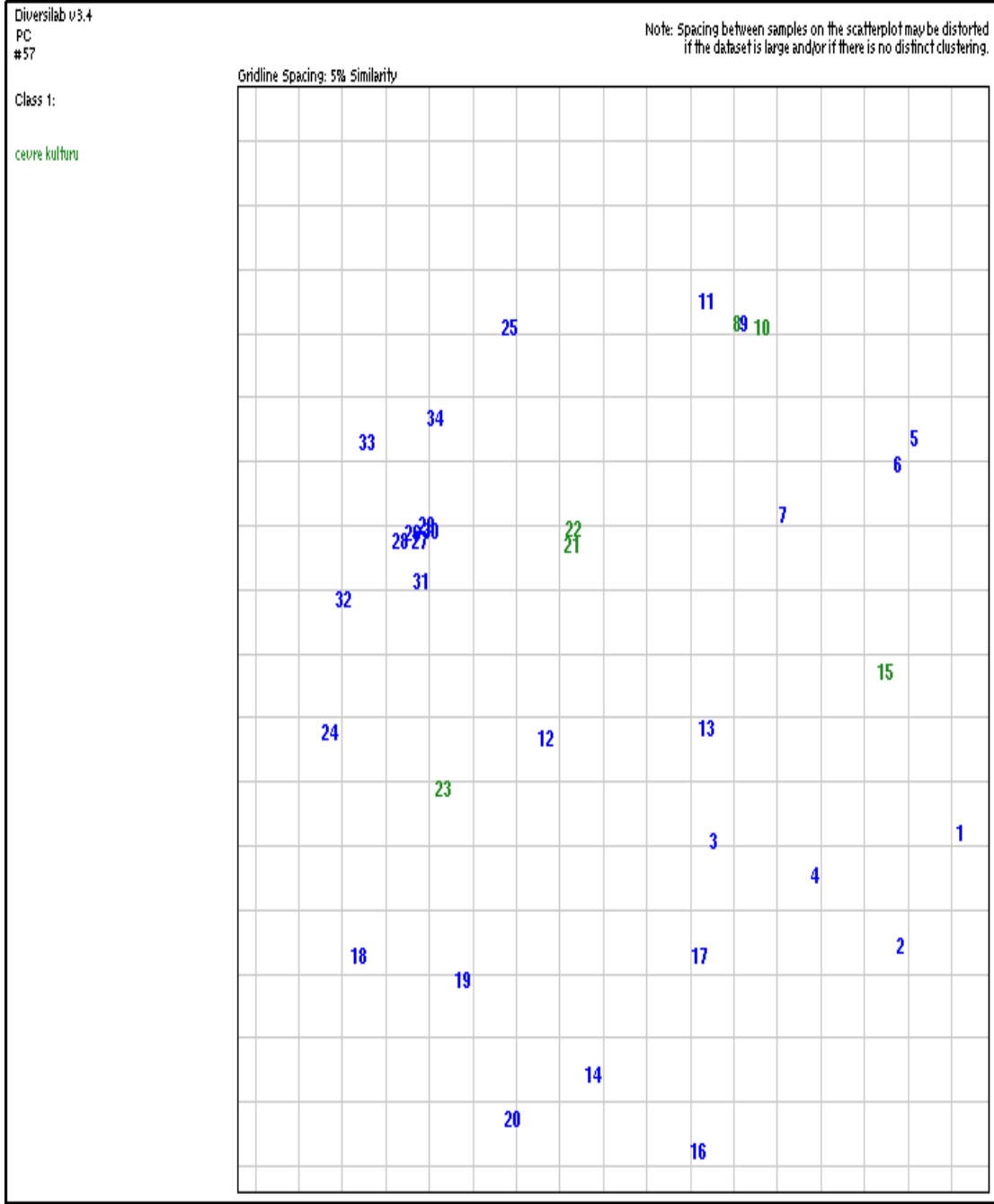


Şekil 2. VRE'nin izole edildiği rektal sürüntü örneklerinin ve çevre örneklerindeki ilişkisini gösteren dendrogram

Diversilab v3.4
PC
#57



Şekil 3. VRE'nin izole edildiği rektal sürüntü örneklerinin ve çevre örneklerindeki ilişkisini gösteren benzerlik matrisi



Şekil 4. VRE'nin izole edildiği rektal sürüntü örneklerinin ve çevre örneklerindeki ilişkisini gösteren noktalama grafiği

Noktalama grafiğinde yeşil renkli rakamlar çevre izolatlarını, mavi renkli olanlar rektal sürüntü izolatlarını göstermektedir.

Bilgisayar software'inden elde edilen verilere göre; VRE izole edilen 8 ve 9 numaralı örnekler arasında benzerlik saptandı. 8 numaralı (etejer sürüntü) örneğinden 16.02.2011 tarihinde, 9 numaralı (rektal sürüntü) örneğinden 27.03.2011 tarihinde VRE suşları izole

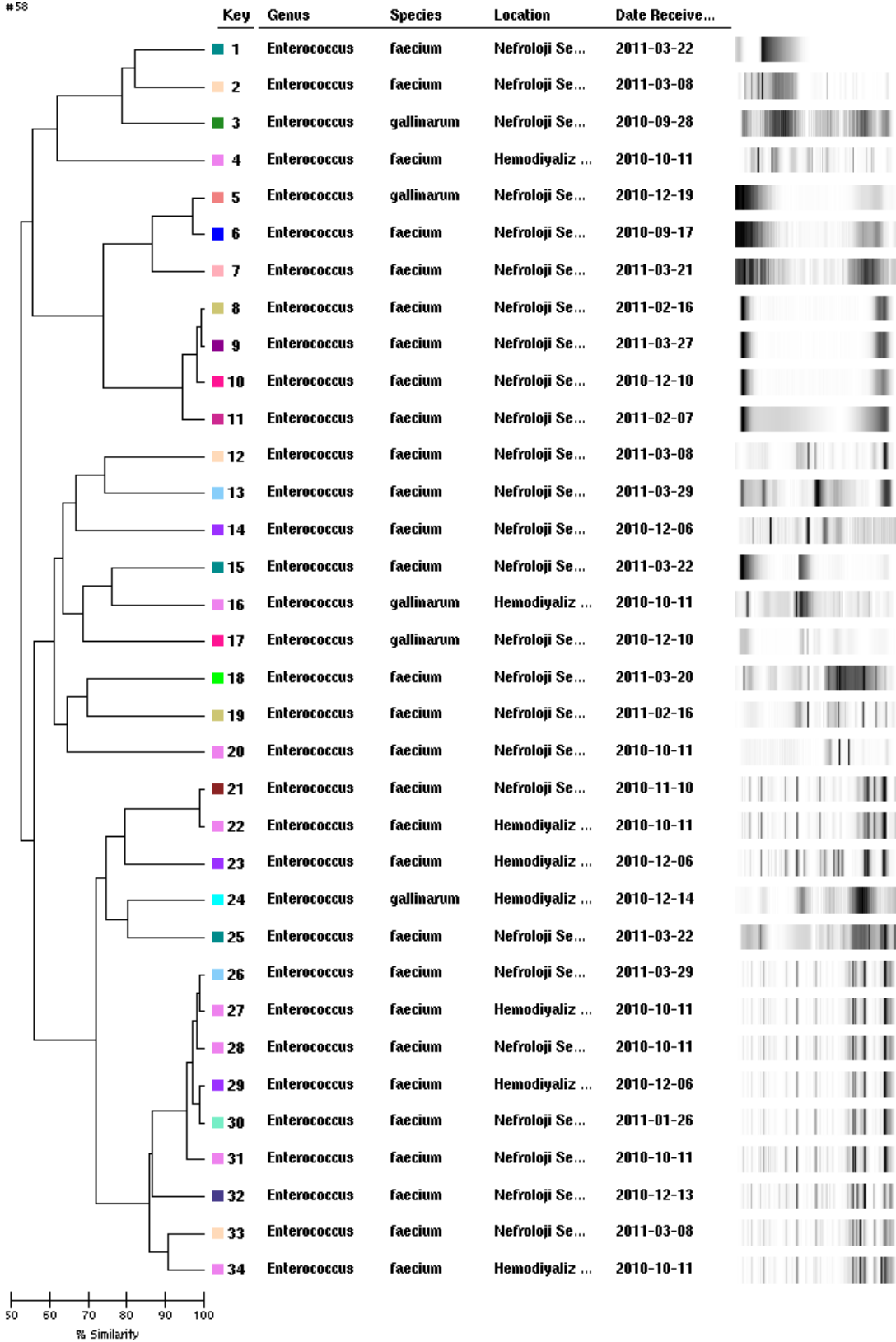
edildi. Her iki örnekte nefroloji servisinden izole edildi, tür olarak *E. faecium* olarak bulundu.

VRE izole edilen 10 numaralı (klozet sürüntü örneği), 15 numaralı (periton diyaliz sıvısı) ve 23 numaralı (klozet sürüntü örnekleri) örnekler hiçbir örnekle benzerlik göstermedi.

VRE izole edilen 21 ve 22 numaralı çevre örnekleri arasında benzerlik saptandı. 11.10.2010 tarihinde nefroloji servisinden alınan 21 numaralı (etejer sürüntü) örnekte ve 11.10.2010 tarihinde HAYBÜ'den alınan 22 numaralı (yatak sürüntüsü) örnekte VRE izole edildi, tür olarak *E. faecium* saptandı.

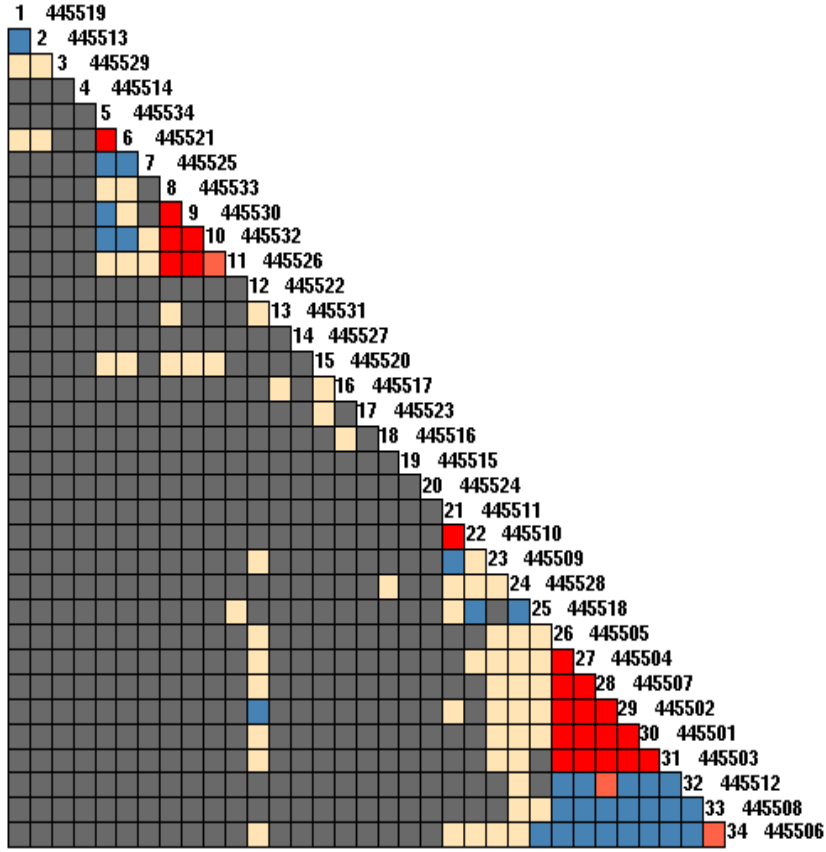
Rektal sürüntü örnekleri incelendiğinde ise 26-27-28-29-30 numaralı suşlar benzer olarak saptandı. 27-29 numaralı suşlar HAYBÜ'nden ve 26-28-30 numaralı suşlar nefroloji servisinden izole edildi.

İzole edilen VRE suşlarının izolasyon tarihleri, izole edildikleri servislere göre dağılımı ve izole edilen türler arasındaki ilişkiye ait dendogram, benzerlik matrisi ve noktalama grafiği, Şekil 5, 6 ve 7'de gösterilmiştir.

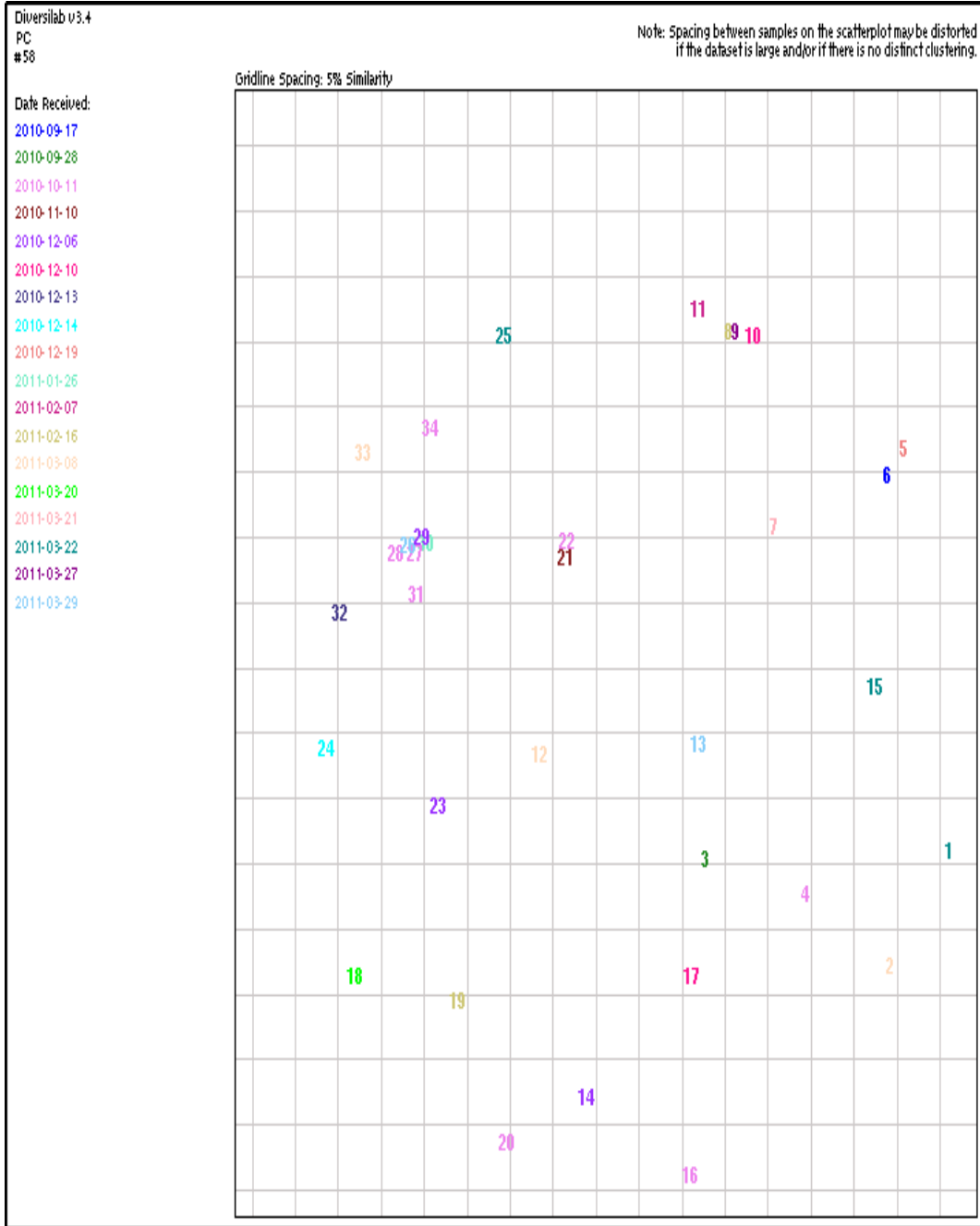


Şekil 5. VRE'nin izole edildiği tarih-klinik-tür ilişkisini gösteren dendrogram

Diversilab v3.4
PC
#58



Şekil 6. VRE'nin izole edildiği tarih-klinik-tür ilişkisini gösteren benzerlik matrisi



Şekil 7. VRE'nin izole edildiği tarih-klinik-tür ilişkisini gösteren noktalama grafiği

Eylül 2010-Ekim 2010 aylarına ait olan nefroloji servisinden alınan 6-3-20-28-31 numaralı suşlar ile HAYBÜ'den alınan 4-16-27-34 numaralı suşlar izole edildi. 27 numaralı (rektal sürüntü) ile 28 numaralı (rektal sürüntü) suşlar arasında benzerlik saptandı. Tür olarak *E. faecium* saptandı.

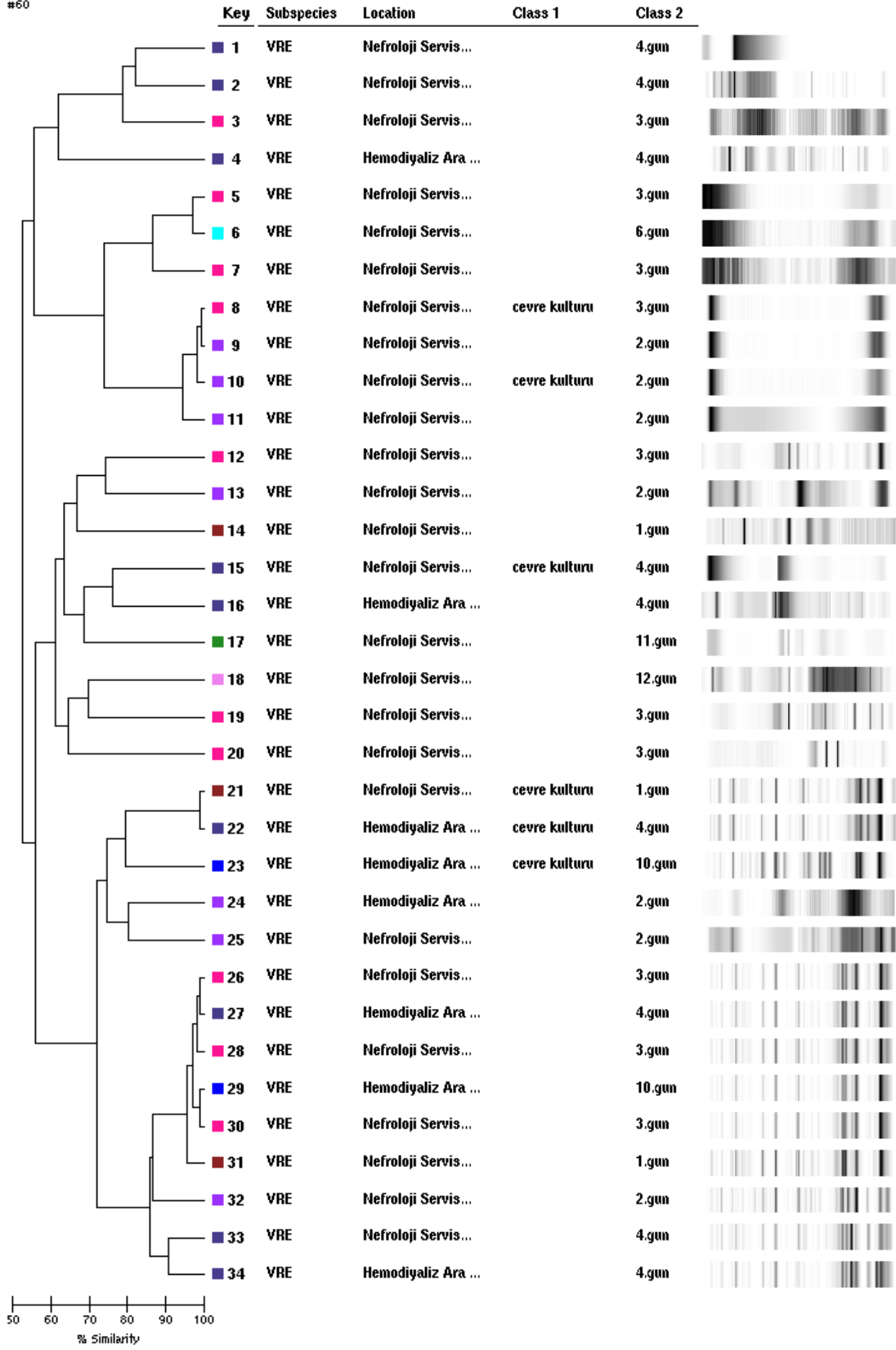
Kasım 2010-Aralık 2010 aylarına ait olan nefroloji servisinden alınan 5-14-17-32 numaralı suşlar ile HAYBÜ'nden alınan 24-29 numaralı suşlar izole edildi. Suşlar arasında benzerlik saptanmadı. 5-17-24 numaralı (rektal sürüntü) suşlar *E. gallinarum* türü ve 14-32-29 numaralı (rektal sürüntü) suşlar *E. faecium* türü olarak saptandı.

Ocak 2011-Şubat 2011 aylarına ait olan nefroloji servisinden alınan 11-30 numaralı suşlar ile HAYBÜ'den alınan 19 numaralı suşlar izole edildi. Suşlar arasında benzerlik saptanmadı. 11-30 numaralı (rektal sürüntü) suşlar *E. faecium* türü ve 19 numaralı (rektal sürüntü) suş ise *E. gallinarum* türü olarak saptandı.

Mart 2011 ayına ait olan nefroloji servisinden alınan 1-2-7-9-12-13-18-25-26-33 numaralı suşlar izole edildi. Suşlar arasında benzerlik saptanmadı. Tüm suşlar *E. faecium* olarak saptandı.

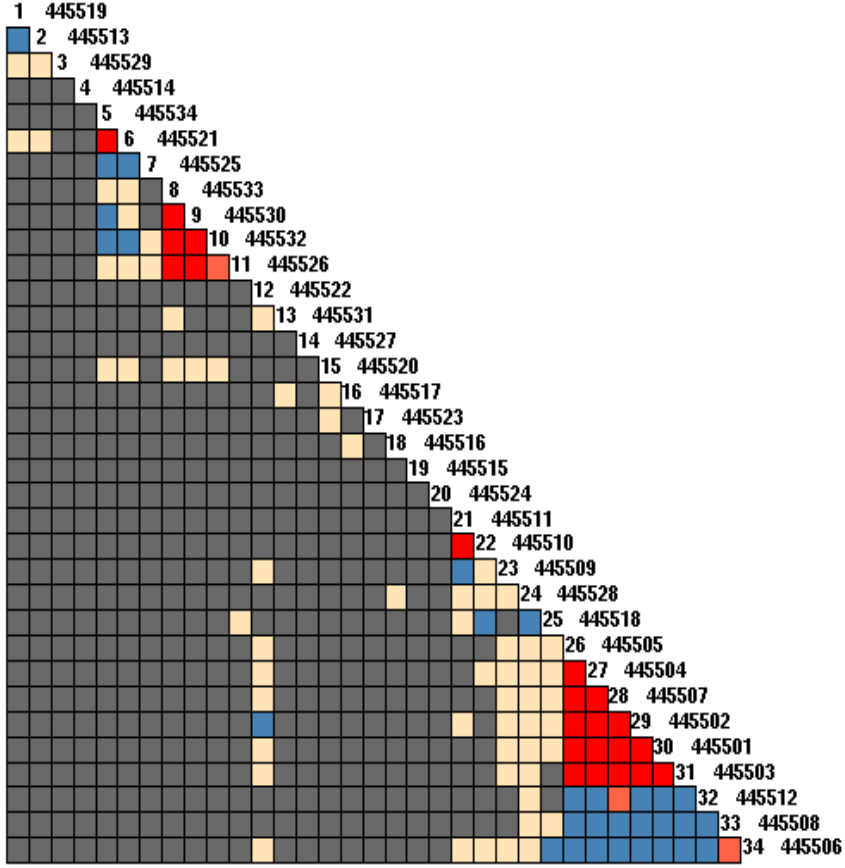
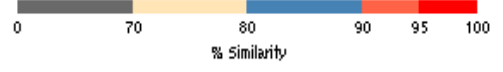
İzole edilen VRE suşlarının hastanın yatış günü ile çevre ve rektal sürüntü örneğinden izolasyon ilişkisini gösteren dendogram, benzerlik matrisi ve noktalama grafiği, Şekil 8, 9 ve 10'da gösterilmiştir.

Diversilab v3.4
PC
#60

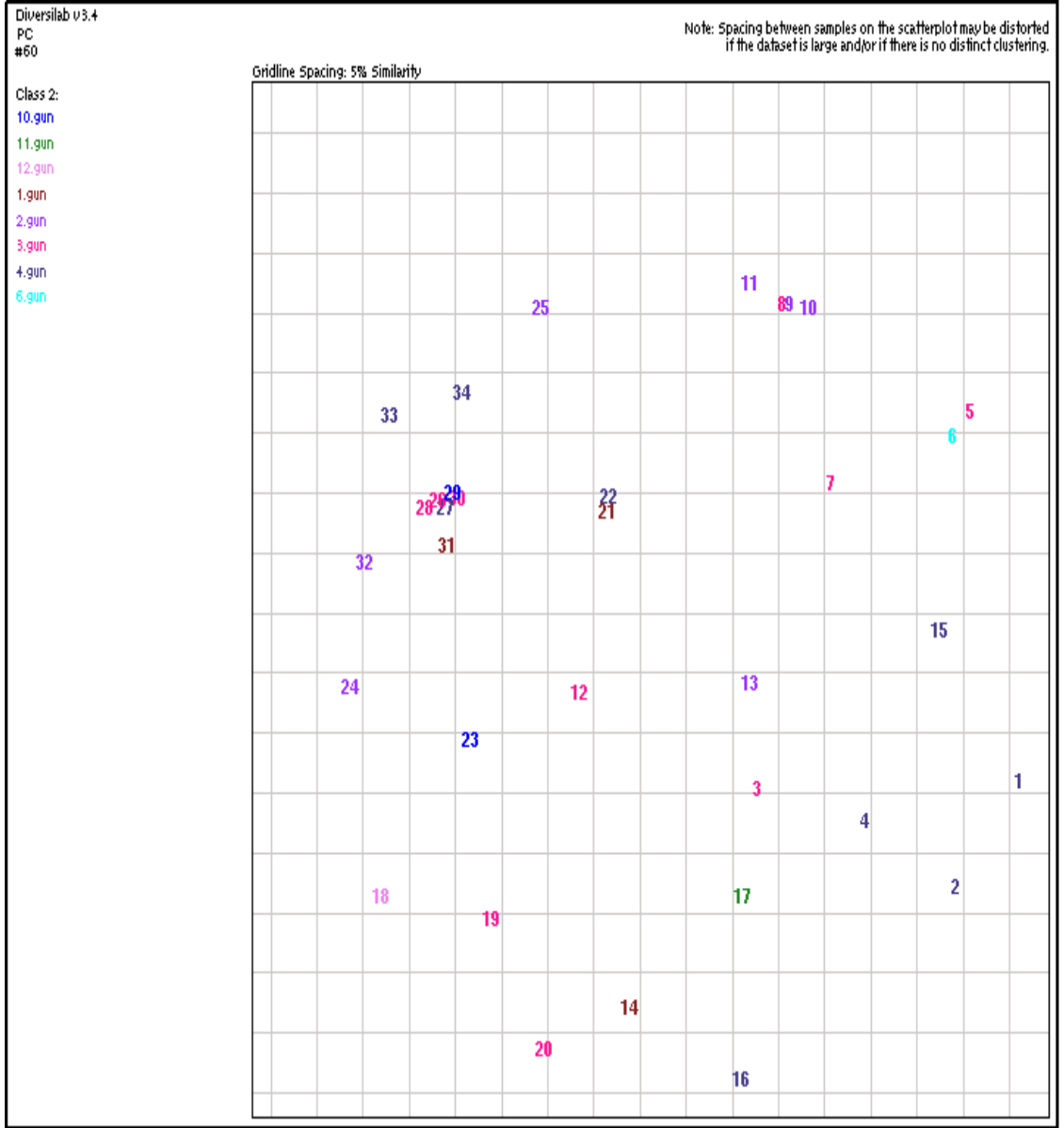


Şekil 8. VRE'nin izole edildiği yatış günü-çevre örneği-klinik ilişkisini gösteren dendrogram

Diversilab v3.4
PC
#60



Şekil 9. VRE'nin izole edildiği yatış günü-çevre örneği-klinik ilişkisini gösteren benzerlik matrisi



Şekil 10. VRE'nin izole edildiği yatış günü-çevre örneği-klinik ilişkisini gösteren noktalama grafiği

Bilgisayar software'inden elde edilen verilere göre VRE izole edilen hastaların yatışının kaçınıcı gününde örnek alındığının ve çevre örneklerinin klinik ilişkisi karşılaştırıldı.

1. gün; nefroloji servisinden alınan 14-31 numaralı (rektal sürüntü) suşlar ile çevre örneğinden alınan 21 numaralı (etejer sürüntü) suşta VRE izole edildi. Hastalara ait örnek ile çevreye ait örnek arasında benzerlik saptanmadı.

2. gün; nefroloji servisinden alınan 9-11-13-32 numaralı (rektal sürüntü) suşlar ve çevre örneğinden alınan 10 numaralı (klozet) suş ile HAYBÜ'nden alınan 24-25 numaralı (rektal sürüntü) suşlar da VRE izole edildi. Rektal sürüntü örnekleri ile çevre örnekleri arasında benzerlik saptanmadı.

3. gün; nefroloji servisinden alınan 3-5-7-12-19-20-26-28-30 numaralı (rektal sürüntü) suşlar ve çevre örneğinden alınan 8 numaralı (etejer sürüntü) suşlar da VRE izole edildi. Hastalara ait olan 26 ve 28 numaralı örnekler arasında benzerlik saptandı.

4. gün; nefroloji servisinden alınan 1-2-33 numaralı (rektal sürüntü) suşlar ve çevre örneğinden alınan 15 numaralı (periton diyaliz sıvısı) suş ile HAYBÜ'nden alınan 4-16-27-34 numaralı (rektal sürüntü) ve çevre örneğinden alınan 22 numaralı (yatak sürüntüsü) suşlar da VRE izole edildi. Rektal sürüntü örnekleri ile çevre örnekleri arasında benzerlik saptanmadı.

6. gün; nefroloji servisinden alınan 6 numaralı (rektal sürüntü) suşta VRE izole edildi. VRE pozitif çevre örneği olmadığı için benzerlik ilişkisi kurulamadı.

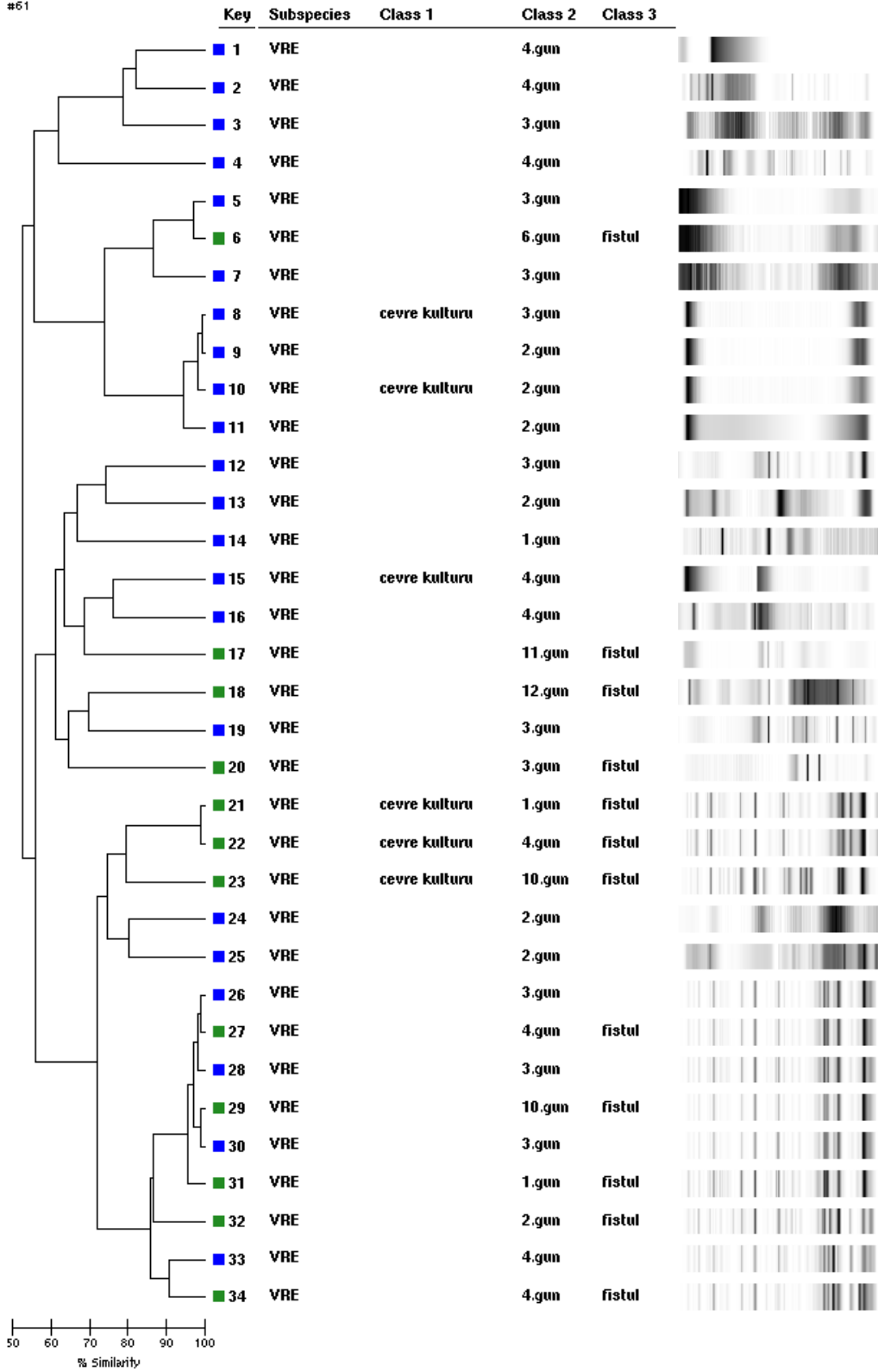
10. gün; HAYBÜ'nden alınan 29 numaralı (rektal sürüntü) suş ve çevre örneğinden alınan 23 numaralı (klozet) suşta VRE izole edildi. Rektal sürüntü örneği ile çevre örneği arasında benzerlik saptanmadı.

11. gün; nefroloji servisinden alınan 17 numaralı (rektal sürüntü) suşta VRE izole edildi. VRE pozitif çevre örneği olmadığı için benzerlik ilişkisi kurulamadı.

12. gün; nefroloji servisinden alınan 18 numaralı (rektal sürüntü) suşta VRE izole edildi. VRE pozitif çevre örneği olmadığı için benzerlik ilişkisi kurulamadı.

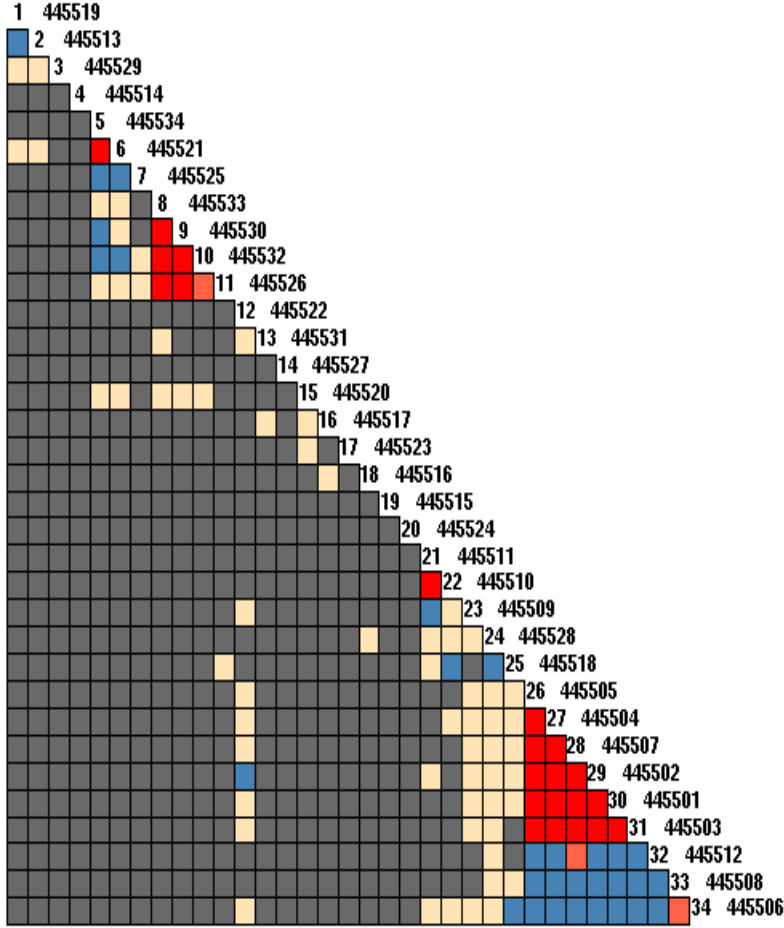
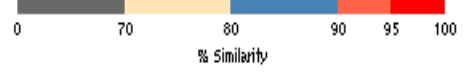
Saptanan VRE izolatlarının (çevre ve hastadan) hastaların yatış günü ve fistül varlığı ile ilişkisini gösteren dendogram, benzerlik matriksi ve noktalama grafiği Şekil 11, 12 ve 13'te gösterilmiştir.

Diversilab v3.4
PC
#61

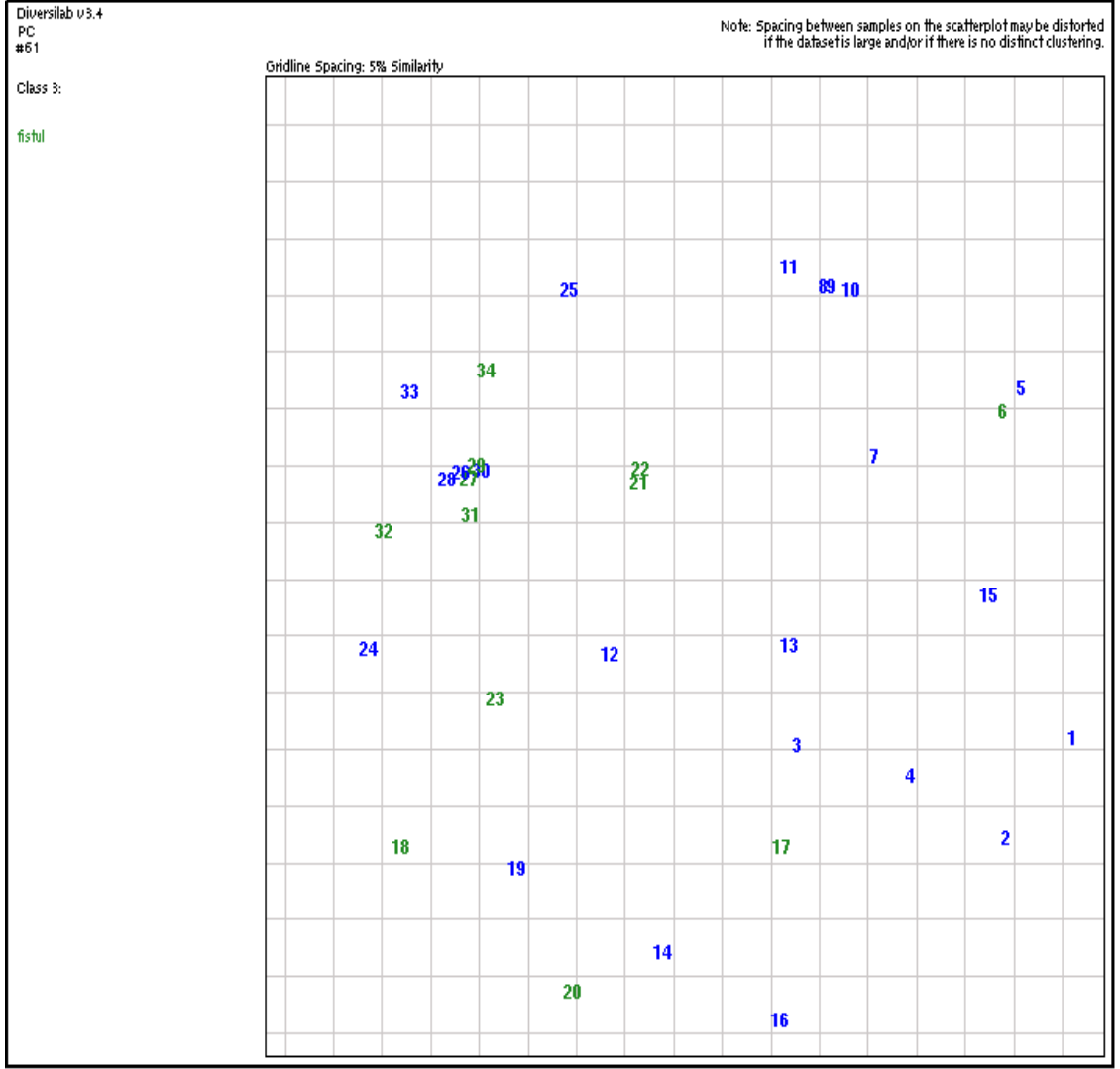


Şekil 11. VRE'nin izole edildiği çevre örneği-yatış günü-fistül ilişkisini gösteren dendrogram

Diversilab v3.4
PC
#61



Şekil 12. VRE'nin izole edildiği çevre örneği-yatış günü-fistül ilişkisini gösteren benzerlik matrisi



Şekil 13. VRE'nin izole edildiği çevre örneği-yatış günü-fistül ilişkisini gösteren noktalama grafiği

Nefroloji servisinde yatışının 3. gününde alınan 19 numaralı (rektal sürüntü) suş ile 8 numaralı (etejer sürüntü) suşta VRE izole edildi ama bu hastada fistül olmadığı için benzerlik ilişkisi kurulamadı.

Nefroloji servisinde yatışının 2. gününde hastalardan alınan örneklerde VRE suşu izole edilmezken, 10 numaralı (klozet sürüntü) çevre örneğinde VRE suşu izole edildi. Hastalarda VRE suşu izole edilmediği için benzerlik ilişkisi kurulamadı.

Nefroloji servisinde yatışının 4. gününde alınan 1 numaralı (rektal sürüntü) suş ile 15 numaralı (periton diyaliz sıvısı) suşlarda VRE izole edildi. Hastada fistül olmadığı için benzerlik ilişkisi kurulamadı.

Nefroloji servisinde yatışının 1. gününde alınan 3 numaralı (rektal sürüntü) suş ile 21 numaralı (etejer sürüntü) suşlarda VRE izole edildi. Hastada fistül bulunduğu halde benzerlik saptanmadı.

HAYBÜ'de yatışının 4.gününde alınan 27 numaralı (rektal sürüntü) suş ile 22 numaralı (yatak sürüntü) suşlarda VRE izole edildi. Hastada fistül bulunduğu halde benzerlik saptanmadı.

HAYBÜ'de yatışının 10. gününde alınan 29 numaralı (rektal sürüntü) suş ile 23 numaralı (klozet sürüntü) suşlarda VRE izole edildi. Hastada fistül bulunduğu halde benzerlik saptanmadı.

5.TARTIŞMA

Giderek karmaşık ve uzun süreli gerçekleşen hospitalizasyon süreci invaziv uygulamalardaki artışla da beraber hastaları enfeksiyonlara oldukça açık hale getirmektedir. Uygunsuz antibiyotik kullanımı ise bu enfeksiyonların giderek daha dirençli etkenlerle oluşmasına yol açmaktadır. Daha sık rastlanan ve daha dirençli etkenlerle oluşan enfeksiyonlar hastalarda mortalite ve morbidite artışının yanı sıra ciddi ekonomik kayıplara da sebep olmaktadır. Bu tür enfeksiyonlar, hastane enfeksiyonları veya hasta bakımıyla ilişkili enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Modern tıbbın gelişim basamaklarından biri de bu enfeksiyonların oluşmadan önlenmesini sağlamaya yönelik uygulamalardır. Bu uygulamalar genellikle hastane enfeksiyon kontrol komitelerinin organize ettiği, hastanede uygulanan sterilizasyon-dekontaminasyon önlemlerinden, izolasyon uygulamalarına dek uzanan, multidisipliner kuralları içermektedir. Kurallar bir zincirin halkaları gibi doğrudan birbirinin sonucunu etkileyen nitelikte olup, uygulamadaki en küçük bir aksama, artmış hastane enfeksiyonu oranları, artmış bakteriyel direnç oranları olarak gözlenmektedir.

İnsan bağırsak florasının doğal üyeleri olan enterokoklar, düşük virulanslarına rağmen, önemli nozokomiyal patojenlerden biridir. Özellikle enterokok kolonizasyonuna yol açabilen sefalosporinler, kinolonlar, beta-laktamlar gibi antimikrobiklerin profilaksi veya tedavi amaçlı sık kullanılması enterokok enfeksiyonlarındaki artışın en önemli nedenidir (136). Enterokokların antimikrobiklerin çoğuna karşı intrensek veya kazanılmış dirence sahip olmaları önemlerini artırmaktadır. Son iki dekada enterokoklarda vankomisin direncine sık rastlanmaktadır. VRE veya glikopeptid rezistan enterokok insidansındaki artışın nedeni Avrupa'da kümes hayvanlarının yemlerine gelişim faktörü olarak eklenen avoparsin kullanımı olmuştur. Avoparsin moleküler yapı olarak glikopeptidlere benzediğinden, Avrupa ülkelerinin çoğunda çiftlik hayvanları, tavuk ölüleri, diğer et ürünleri ve bunların atık suları infekte etmesi ile hayvanlar arasında *Van A* tipi glikopeptid rezistan enterokoklar ciddi problem haline gelmiştir. Bu zengin rezervuar çeşitliliği gıda zinciri ile insanlara da yansımış ve

toplumda VRE kolonizasyon oranı % 2-12'ye dek yükselmiştir. Ancak 1994 yılından itibaren birçok ülkede avoparsin kullanımının yasaklanması ve hastalarda glikopeptit grubu antibiyotiklerin kısıtlı kullanımı sonucu bu ülkelerden bildirilen VRE oranlarında azalma tespit edildiği bildirilmiştir (137). Enterokok türlerinde vankomisine duyarlı ve dirençli suşlar arasında virulans farkı yoktur. Ancak vankomisine duyarlı suşlarla olan bakteriyemilerde mortalite oranı % 13.6-27 arasında iken, enterokokun vankomisine dirençli olması durumunda bu oran % 36.6-52'ye çıkmaktadır (136).

İlk VRE suşu 1988 yılında Uttley ve ark. (81), tarafından İngiltere'den bildirilmiştir. Hemen ardından Fransa, Belçika, Almanya gibi diğer Avrupa ülkelerinden bildirilmiş, ABD'de daha sonra saptanmış ve çok hızlı bir yayılım göstermiştir. Yurdumuzda ilk VRE suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden bildirilmiş ve bunu diğer olgular izlemiştir (137).

Vankomisin için MİK değerleri agar dilüsyon, agar gradient dilüsyon, broth makrodilüsyon yöntemlerinden birisi ile saptanmalı ve inkübasyon süresi 24 saat olmalıdır. Disk difüzyon yönteminde ise plakların 24 saat inkübasyonu ve inhibisyon zonlarının ışık altında okunması önerilmektedir (35). Tenover ve ark. (138), yaptıkları çalışmada, enterokoklarda disk difüzyon yöntemiyle glikopeptid direncini saptamanın güç olduğunu bildirmişlerdir. Yamane ve ark. (139), disk difüzyon yönteminin vankomisine dirençli enterokok ve vankomisine duyarlı enterokok ayırımını yapmada yetersiz kaldığını, Vitek otomatize yönteminin *VanA* ve *VanB* direncinin saptamada yanlış sonuçlar verdiğini, E test ve agar tarama yönteminin en güvenilir yöntemler olduğunu, eğer dirençli veya orta duyarlı bir suş saptanırsa mutlaka PCR ile *VanA*, *VanB* direnci bakılması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda vankomisin direnci disk difüzyon yöntemi ile çalışılmış, dirençli suşların E test ile MİK değerleri belirlenmiştir. VRE tespitinde daha kısa çalışma süresi ile ön plana çıkan bir diğer yöntem de PCR'dır. Benadof ve ark. (140), VRE tespitinde kültür yöntemi ile PCR yönteminin kıyasladıkları çalışmalarında zaman açısından moleküler testlerin avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

E. faecalis (% 85-90) ve *E. faecium* (% 5-10) klinik izolasyonu en fazla olan enterokok türleridir. *E. casseliflavus* ve *E. avium* gibi diğer enterokok türleri de giderek artan oranlarda saptanmaktadır. Şekercioğlu ve ark. (141), yaptıkları çalışmada, 30 enterokok suşunun % 50'si *E. faecalis*, % 47'si *E. faecium* ve % 3'ü *E. avium* olarak saptanmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *E. faecium*'un daha sık izole edildiği, *E. faecalis*'in *E. faecium*'a oranının 3.7/1'den 1.9/1'e düştüğü belirtilmektedir (142).

Enterokok türleri arasında klinik öneme sahip olan VRE'lerin tür dağılımı da, enfeksiyonun lokalizasyonu, hastanın takip edildiği servis, hastanede antibiyotik kullanım politikalarına bağlı olmak üzere hastaneler ve bölgeler arasında değişiklikler göstermektedir. Ancak tüm dünyada gerek hastane enfeksiyonları gerekse kolonizasyonla ilgili olarak izole edilen VRE türleri arasında *E. faecium* oranının giderek arttığı dikkat çekmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle bakteriyemiye yol açan *E. faecium* izolatları arasında VRE oranının (% 19), *E. faecalis* izolatları arasındaki VRE oranına (% 4) göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. ABD'de yapılan uzun dönemli bir epidemiyolojik bir çalışmada; 1995-2002 yılları arasında izole edilen VRE izolatları diğer glikopeptid türevi antibiyotiklere direnç oranları ve türler arasındaki farklılıkların tespiti amacı ile değerlendirilmiş ve *E. faecium* suşlarında, tüm glikopeptid türevlerine karşı *E. faecalis*'e oranla çok belirgin bir direnç artışı tespit edilmiştir (143). Kanada'da üriner sistem enfeksiyonları ve bakteriyemilerden izole edilen VRE'lerin % 98.3'ünün *E. faecium*, % 1.7'sinde *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir (144).

Schouten ve ark. (145), Avrupa'da VRE prevalansının belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada 27 ülkeden toplam 49 laboratuvar verileri çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta örneklerinden elde edilen 4208 enterokok suşu değerlendirilmiş ve *E. faecalis* % 83 (n:3493) ile en sık tespit edilen tür olurken ikinci sıklıkla %13.6 (n:574) ile *E. faecium* ve % 1.2 (n:49) *E. gallinarum* üçüncü sırada yer almıştır. *VanA* tipi direnç (n:18) en sık görülen direnç tipi iken bunu *VanB* tipi direnç (n:5) takip etmiştir. *VanC* tipi direnç ise çalışma kapsamında en sık Türkiye ve Litvanya'dan izole edilmiştir. Hastanemizde Zer ve ark. (146), yaptığı bir çalışmada da izole edilen 81 VRE suşunun tamamı *E. faecium* olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da izole ettiğimiz VRE izolatlarının % 85'i *E. faecium*, % 15'i *E. gallinarum* olarak bulundu, *E. faecalis* ise saptanmadı. *E. gallinarum* yapısal olarak *VanC* türünde dirence sahip, vankomisin MİK değeri 8-16 µg/mL olan bir enterokok türüdür. Aslında bu çalışmanın vankomisine dirençli enterokok suşları ile yapılması planlanmışken, 5 örnekte *E. gallinarum*'a rastlanmasıyla bu suşlar da çalışmaya alınmıştır. Bu suşlarda dirençten sorumlu gen bölgesi hareketli genetik yapılarda değil kromozom üzerinde bulunduğundan yapısal olmayan direncin aksine horizontal geçiş olmaz ve izolasyon önlemlerine gerek yoktur. Bununla beraber, klonal

bir benzerlik olup olmadığının araştırılması amacıyla bu suşlar çalışmaya dahil edilmiştir.

VRE kolonizasyonunun yayılmasını engellemek ve kolonize hastalarda enfeksiyonu önlemek önemlidir. Bu nedenle periyodik rektal ve perirektal sürüntü örneklerinin alınması VRE kolonizasyonunu tespit etmede altın standarttır. Landman ve ark. (147), hastane kaynaklı VRE kolonizasyonu ile ilgili çalışmalarında; hastanede yatan 189 hastadan perirektal sürüntü örnekleri almışlar ve 101 (% 53) hastada VRE kolonizasyonu tespit etmişlerdir. Ceryan ve ark. (148), yaptığı bir çalışmada, rektal sürüntü kültüründen elde edilen 197 enterokok suşundan, 5'inde (% 2.5) vankomisin direnci saptamışlardır. Harris ve ark. (149), cerrahi yoğun bakım ünitesinde yaptıkları çalışmada 1362 olgunun 136'sının (% 10) VRE ile kolonize olduğunu bildirmişlerdir. Grayson ve ark. (150), 134 yoğun bakım hastasını içeren çalışmalarında bir (% 0.7) hastada VRE kolonizasyonu saptanmıştır. Gordts ve ark. (151), ise 636 hastanın 22'sinde (% 3.5) VRE izole etmişlerdir. Çalışmamızda 100 hastadan rektal sürüntü örneği alınmış ve 28'inde (% 28) (22'si nefroloji servisi, 6'sı HAYBÜ) VRE kolonizasyonu saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan oranın yüksek olması, VRE kolonizasyonu için yüksek risk taşıyan bir hasta popülasyonu ile çalışılmasına bağlanmıştır.

VRE kolonizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda risk faktörlerinin hastaya ait faktörler (immünsupresyon, nötropeni, böbrek yetmezliği gibi), hastaneye ait faktörler (yoğun bakım ünitesinde yatış, onkoloji ünitesinde yatış, uzun süreli yatış öyküsü gibi), ve başta vankomisin olmak üzere antibiyotik kullanımı olduğu bildirilmiştir (152).

Vankomisine dirençli enterokoklar için risk grubunu oluşturan hastalarda daha yüksek oranda VRE kolonizasyonu ve enfeksiyonuna rastlanmaktadır. Ankara'da yapılmış bir çalışmada (148); üç gün ya da daha uzun süre hastanede yatan hastalardan rektal sürüntü örnekleri alınmış ve izole edilen 197 enterokok suşundan 5'inde (% 2.5) vankomisin direnci saptanmıştır.

Padiglione, Avusturalya'da üç üniversite hastanesinin VRE açısından risk taşıyan 11 ünitesinde (3 böbrek, 5 YBÜ, 2 transplantasyon ünitesi, 1 hematoloji-onkoloji ünitesi) 15 aylık dönemde 3458 hastanın 8953 rektal örneğinde yaptığı bir çalışmada 66 hastada VRE kolonizasyonu bildirmiştir (% 77 *E.faecium*, % 23 *E. faecalis*). VRE kolonizasyonu en fazla böbrek hastalarının takip edildiği merkezde saptanmıştır (153).

İtalya'da yapılmış bir çalışmada yoğun bakım üniteleri (YBÜ) dışında yatan hastalarda VRE kolonizasyon oranı % 0-4; yoğun bakım, onkoloji ve diyaliz hastalarında ise % 14-18 oranında saptanmıştır (154). İsrail'de yapılan bir çalışmada VRE rektal taşıyıcılığı prevalansı iki farklı risk grubunda, yoğun bakım ünitesinden 61 hastada ve diyalize giren 92 hastada araştırılmıştır. YBÜ'ndeki hastaların 14'ünde (% 23), diyalize giren hastaların 4'ünde (% 4.3) VRE taşıyıcılığı saptanmıştır. Bu iki grupta da uzun süre antibiyotik kullanımı (özellikle vankomisin) önemli risk faktörü olarak bildirilmiştir (155). Çalışmamızda VRE kolonizasyonu saptanan 28 hastadan; hemodiyalize giren 11 (% 39) hasta ve periton diyalizine giren 5 (% 18) hasta, toplamda 16 (% 57) hasta diyalize idi. 28 hastanın 25'i (% 89) farklı gruplarda antibiyotik tedavisi alırken aynı zamanda da 8'inde (% 29) vankomisin kullanma öyküsü vardı. Vankomisin kullanımının da çalışma grubumuzdaki hastalarda VRE kolonizasyonu için risk faktörü olduğu söylenebilir.

Elizage, uzun dönem bakım merkezlerinde kalan 100 kişide VRE kolonizasyonu açısından risk faktörlerini irdelemiş ve 45 hastada VRE saptamıştır. 60 gün öncesinde hastanede yatış, beslenme tüpü, idrar sondası, bası yarası varlığı, ve 60 gün içerisindeki antibiyotik kullanımının anlamlı risk faktörleri olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma da antibiyotikler vankomisin, sefalosporin ve diğer antibiyotikler olarak sınıflanmış ve her birinin VRE açısından risk faktörü olduğu bulunmuştur (156).

Ostrowski ve ark. (98), cerrahi YBÜ'sinde VRE kolonizasyonunu % 12 olarak bulmuş ve risk faktörleri olarak ise 2. ve 3. kuşak sefalosporin kullanımı, uzun süre hastanede yatış, solid organ transplantasyonu, yoğun bakım ünitesinde yatışı tespit etmişlerdir.

Byers ve ark. (157), ise YBÜ'sinde VRE kolonizasyonunu % 6 olarak bulmuş ve risk faktörlerini VRE'li hasta ile temas, multiple travma ve metronidazol kullanımı olarak bildirmişlerdir.

Warren ve ark. (158), YBÜ'sinde VRE kolonizasyonunu % 32 olarak bulmuş risk faktörleri olarak ise; YBÜ'ye gelmeden önce en az 3 gün hastanede yatmış olmak, diyaliz, hastaneye başvurusundan daha önceki bir yıl içinde iki ya da daha fazla hastane başvurusu olarak tespit etmişlerdir.

Son zamanlarda yayınlanan birçok çalışmada, VRE'lerin hastadan hastaya direkt veya personelin elleri, kontamine hasta bakım ekipmanları ve çevre ile indirekt olarak geçişinin mümkün olduğu vurgulanmaktadır. Vankomisin duyarlı enterokok suşları hastane ortamlarında ortalama 58 gün boyunca yaşamlarını sürdürebilmekte iken

vankomisin direnci söz konusu olduğunda bu süre 9 aya kadar uzayabilmektedir (6). Noskin ve ark. (159), hastane malzemeleri ve ortam örnekleri üzerinde yaptıkları çalışmada *E. faecalis*'in ortalama olarak 5 gün ve *E. faecium*'un ise ortalama 7 gün boyunca hastane ortamında canlılığını sürdürebildiğini ve hastane personeli ve hastaları kolonize edebildiklerini ortaya koymuşlardır. Livornese ve ark. (51), yaptıkları benzer bir çalışmada ise enterokok türlerinin hastanede mevcut olan kutu yüzeylerde ortalama iki ay süresince canlılıklarını sürdürebildikleri ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda da çevreden alınan örneklerin 6'sından VRE izole edilmiş olup, suşların 5'i hastaların gaitaları ile temas etme ihtimali daha yüksek olan yüzeyler (yatak, klozet ve etejer sürüntüsü) olarak bulunmuştur.

rep-PCR tipleme yönteminde; çoğu bakterinin genomu boyunca dağılım gösteren tekrarlanan DNA dizilimlerine komplementer olan primerler kullanılarak tekrarlar arasında kalan DNA dizilimlerinin amplifikasyonu yapılmaktadır. Suşlar arasında tekrar elementlerinin sayısı ve lokalizasyonu farklı moleküler tipleme için gerekli olan tipe özgü bant profilini oluşturmaktadır. rep-PCR; kültürden olduğu gibi direkt klinik örneklerden yapılan DNA ekstraksiyon ürünleriyle de çalışılabilir. Tekrarlanan elementlerin dizilimlerin ve kullanılacak primerlerin baz diziliminin bilinmesi zorunlu değildir. Sıklıkla tek bir primer seti kullanılarak gram-negatif ve gram-pozitif bir çok bakteride tiplendirmeyi sağlayacak yeterlikte bant profili oluşturulmaktadır (160).

rep-PCR, RFLP gibi moleküler tipleme yoluyla suşlar arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada en sık kullanılan PCR bazlı tipleme yöntemlerindedir. rep-PCR tipleme kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi ve ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle bakteriyel popülasyonların filogenetik yapıları ve taksonomik farklılıklarını belirlemede de kullanılabilir (160).

Bou ve ark. (161), yaptıkları çalışmada rep-PCR ile PFGE arasında korelasyon saptanmış, rep-PCR, AP-PCR'dan daha yüksek ayırt ettirici olarak belirtilmiştir. rep-PCR; hızlı, kolay, yararlı ve sonuçları PFGE ile karşılaştırılabilir bir yöntem olarak görülmektedir. rep-PCR ve AP-PCR için bakteriler katı besiyerinde üretildikten sonra 10 saatten az bir süre yeterli iken, PFGE için bu sürenin en az 90 saatte uzadığı bildirilmektedir (161). Çalışmamızda rep-PCR kullanılmış ve katı besiyerinde üreme olduğu andan itibaren 4 saat içerisinde sonuç alınabilmiştir.

Silbert ve ark. (162), yaptıkları bir çalışmada Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR), otomatize ribotipleme ve PFGE'yi karşılaştırılmış;

ERIC-PCR'in yorumlanması diğer ikisinden daha karmaşık ve zor, ERIC-PCR ve ribotiplemenin PFGE'den daha kısa zaman alan, otomatize ribotiplemenin de diğerlerinden daha pahalı olduğu sonucuna varmışlardır.

Yeni çalışmalarda; rep-PCR'da yapılan modifikasyonlarla üretkenliğin ve ayırım gücünün arttığı rapor edilmiştir (163). Otomatik rep-PCR'a uygulanan kombine modifikasyonlarla rep-PCR'ın üretkenliği artmış, döngü zamanı, maliyet ve şablon gereksiniminin azaldığı bildirilmiştir. rep-PCR ampikonlarının agaroz jel ile ayrılmasıyla laboratuvarlar arası yetersiz sonuçların ortaya çıktığını ve klinik açıdan hantal olduğunu bildiren bir çalışmada, çalışma süresinde kısalma ve çalışan sayısında azalmanın da sağlandığı vurgulanmıştır (163). DiversiLab yazılımı standart bir algoritma kullanır ve otomasyonun örnek analizi rapor da dahil olmak üzere 13 örnek için 4 saattir ki bu durum moleküler çalışmalar için uygun bir süredir. Genotipleri belirleme yöntemleri epidemiyolojik çalışmalarda ve parmak izleri kalıplarının karşılaştırılması en kritik noktadır. DNA konsantrasyonundaki değişimler özel bazı işlemler ve laboratuvar olanakları test sonuçlarını etkilememelidir. Bu çalışmada kullandığımız DiversiLab sistemi insan faktörünü en aza indirgeyen otomatize bir sistemdir. DiversiLab sistemi döngü zamanının ve teknik personel zamanının önemli olduğu klinik laboratuvarlarda çok cazip bir sistemdir. rep-PCR çalışmasının en yoğun emek gerektiren kısmı DNA ekstraksiyonudur ve manuel DNA saflaştırma prosedürlerinin otomatik sistemlerle yapılması üzerinde araştırmalar sürmektedir (163). DiversiLab sisteminde bazı potansiyel sınırlamalar vardır. Şu anda önerilen DNA ekstraksiyon prosedürü teknik olarak basit olsa da emek açısından çok yükündür. Sistemde gelişmeye ihtiyaç olan kısım burasıdır. Her ne kadar kitler için pozitif ve negatif kontrol olsa da veri tabanında pozitifler için karşılaştırma yoktur. Örneğin saf kültür olması çok kritik bir noktadır. Örnek Chip içerisindeki mikroakışkan kuyucuklara doldurulurken hava kabarcıkları olması bir sorundur. Bu olduğunda test tekrarlanmalıdır. Bu durumda zaman kaybolmakta ve testin tekrarlanmasını gerektirmektedir. DiversiLab'ın maliyet açısından mantıklı olması için 12 örnek ve 1 pozitif kontrol ya da kontrol yoksa 13 örnek test edilmelidir. Çünkü mikroakışkan Chip içerisinde 13 kuyucuk vardır ve örnek koyulmayan kuyucuklar jel matriksi bozulacağından tekrar çalışılmaz (163).

Klasik yöntemlerde oluşan DNA bantlarını karşılaştırmak oldukça zor ve zaman alıcıdır. DiversiLab web bağlantılı bir yazılımla saptamış olduğu DNA dizilerini otomatik olarak

veri tabanıyla karşılaştırmakta, sonuçları, farklı şekillerde (dedogram, benzerlik matrisi ve noktalama grafiği) vererek yorum ve karşılaştırmayı kolaylaştırmaktadır. Üstelik çalışmak için, klasik parmak izi yöntemleri kadar laboratuvar alt yapısı gerektirmemektedir.

Salgınları zamanında fark edebilmek için özellikle bazı kritik birimlerde aktif VRE sürveyansı yapılmalı, gerektiğinde etkenin kaynak araştırılması yapılmalıdır.

Kuru yüzeylerin ve hasta odalarındaki tıbbi ekipmanın uygun dezenfeksiyonu, el dezenfeksiyon protokolüne tam uyum ve antibiyotiklerin dikkatli kullanımı hastane kaynaklı etkenlerin geçişinin önlenmesinde çok önemlidir (164).

Rutin olarak çevre örneklerinin alınması ise önerilmemektedir. Ancak salgınlar sırasında çok önemli bilgiler sağlanması ve salgın yapan mikroorganizmanın rezervuarının saptanması amacıyla mutlaka çevresel örnekleme yapılmalıdır. Terminal dezenfeksiyon ve öncesinde uygun temizlik aşaması bazı ünitelerde enfeksiyon kontrolünde faydalı olmaktadır. Tüm bu önlemler ve yaklaşımlar ancak etkili el yıkama, izolasyon ve genel öneriler uygulanabilirse faydalı olabilecektir (165).

Çalışmamızda çevreden izole edilen 8 numaralı (etejer sürüntü) örnek ile, 9 numaralı hasta örneği DNA dizileri açısından benzer bulunmuştur. Bu iki suşun izolasyon zamanları göz önüne alındığında hastaya çevresel kaynaklardan bulaşmış olabileceği söylenebilir. Nefroloji servisinde alınan 21 numaralı (etejer sürüntü) suş ile HAYBÜ'den alınan 22 numaralı (yatak sürüntü) suşların identik olması oldukça ilginç bir bulgu olarak değerlendirildi. İki servis arasında ortak personelin hizmet etmesi, bazı ekipmanların ortak kullanımı, hasta ziyaretlerinin ortak yapılması gibi bazı faktörlerin mikroorganizmanın klinikler arasındaki transferinde etkisinin olabileceğini düşündürdü. Rektal sürüntü örneklerinden 26-27-28-29-30 numaralı örnekler benzer idi. Benzer bulunan bu 5 örnekten 2'si HAYBÜ'de, 3'ü nefroloji servisinde yatmakta idi. Bu iki servis arasında sık hasta transferi olmasından dolayı benzer suşların hastalar arasında yayılmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Zaman dağılımı açısından enterokok izolasyonları arasında benzerlik saptanmadı.

Hastaların kliniğe yatış süreleri baz alınarak VRE dağılımı incelendiğinde, yatışının 1. gününde iki hastada, yatışının 2. gününde 4 hastada, yatışının 3. gününde 9 hastada VRE saptandı. Yatışının 1.gününde saptanması KBY hastalarının başka sağlık kuruluşlarında yatmalarından, diyaliz veya tetkik yaptırmak amacıyla sık hastane ziyaretinde bulunmalarında kaynaklanıyor olabilir. Nitekim günümüzde “nozokomiyal”

tanımı “sağlık bakımıyla ilişki” olarak yeniden düzenlenmiştir. En fazla 3. günde VRE izolasyonuna rastlanması da kolonizasyonun özellikle 72. saatten itibaren yaygınlaştırdığını düşündürebilir. 3. günde hastalardan izole edilen 2 örneğin identik olması da bu fikrimizi desteklemektedir. Bunun yanı sıra kliniğe kabul edilen hastalarda 1. gün kültür alınsa dahi sonuçlar 48-72 saatte raporlanmaktadır. Bu süre içerisinde de var ise VRE'nin diğer hastalara yayılabileceği unutulmamalıdır.

Bu çalışmada çevresel kaynakların bulaş açısında araştırılması amaçlanmıştır. Çevreden almış olduğumuz örneklerden saptanan VRE izolatları ile hastalardan izole edilenler karşılaştırıldığında sadece 1 örnekte benzerlik saptanmış, buna rağmen hastalardan izole edilen suşların 5'inde benzerlik bulunmuş, bu da bize bulaş kaynağının çevre değil, hastadan hastaya olduğunu düşündürmüştür. Çalışmamızın yapıldığı birimlerde dekontaminasyon kurallarına, izolasyon kurallarından daha fazla uyulmuş olduğu söylenebilir. İnfeksiyon kontrol protokollerinde bir klinikte VRE'li bir hasta saptanması durumunda sıkı temas izolasyonu uygulanması önerilmektedir. Sıkı temas izolasyonunda hastaların ayrı banyo, tuvaleti olan bir odaya alınması, hasta odasına girerken bariyer önlemlerinin alınması ve hastaya ait olan çeşitli ekipmanların odadan çıkarılmaması gibi önlemler alınması gerekirken, bu tedbirlerin çalışmamızın yapılmış olduğu birimlerde tam olarak uygulanmadığı düşünülmüştür.

6. SONUÇLAR

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hemodiyaliz Ara Yoğun Bakım Ünitesi ve nefroloji servisinden Eylül 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında kronik böbrek yetmezliği tanısıyla yatmakta olan 100 hastadan rektal sürüntü örnekleri ve eş zamanlı çevre örneklerinden izole edilen Vankomisin Rezistan *Enterococcus* suşları ile yapılan bu çalışmadaki veriler şu şekilde özetlenebilir;

Çalışmaya 28'i hastaya ait rektal sürüntü örneklerinden ve 6'sı çevre örneklerinden saptanan toplam 34 VRE suşu dahil edildi.

1. Hastalar 18-85 yaşları arasında idi.
2. Toplam 100 hastadan rektal sürüntü örneği alındı.
3. VRE izole edilen hastaların 16'sı (%57.1) kadın ve 12'si (%42.9) erkek olarak bulundu.
4. Nefroloji servisinden 22 (%26.8) hastada, Hemodiyaliz Ara Yoğun Bakım Ünitesi'nde 6 (%33.3) hastada VRE izole edildi.
5. 28 hastadan 25'i (%89) farklı gruplarda antibiyotik tedavisi almakta idi. Bu hastalardan 8'i (%29) aynı zamanda da vankomisin tedavisi almakta idi.
6. Çevresel yüzeylerden alınan sürüntü örneklerinden 6 VRE suşu izole edildi..
7. Çalışmaya alınan 34 suşun tür tayini sonucunda *E. faecium* %85 (n:29) ve *E.gallinarum* %15 (n:5) oranında bulundu.
8. 5 hastanın (26-27-28-29-30 numaralı) rektal sürüntü örneklerinden izole edilen suşlar benzer bulundu. Bu hastaların 3'ü nefroloji servisinde tedavi görmekte olup 2'si HAYBÜ'de tedavi görmektedir.
9. 8 numaralı (etejer sürüntü) örnekle 9 numaralı (rektal sürüntü) örnek benzer bulundu.
10. 21 numaralı (etejer sürüntü) örnekle 22 numaralı (yatak sürüntü) örnek aynı bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Spelman DW. Hospital-acquired infections. *MJA Practice Essentials*. 2002; 176:286-291.
2. Danielle MZ, Garrison MM, Allpress AL, Heath J, Christakis DA. Infection Control Policies and Hospital-Associated Infections Among Surgical Patients: Variability and Associations in a Multicenter Pediatric Setting. *Pediatrics*. 2005; 115: 387-397.
3. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 512-530.
4. Huycke M, Sahm D, Gilmore M. Multiple drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4: 239-249.
5. Akan ÖA. Enterokok türlerinin mikrobiyolojisi. Ed: Ünal S, Vahapoğlu H. *Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar*. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2004; 5-9.
6. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Procop G, Woods G. *Color Atlas and Textbook of Diagnostik Microbiology*. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Co 2005: 700-711.
7. Gültekin M. Enterokoklar: Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi*. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara 2004: 121-140.
8. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1563-1571.

19. Hoffman SA, Moellering RC. Jr. The enterococcus: “ Putting the bug in our ears”
Ann. Intern. Med. 1987; 106: 757-761.
20. Korten V: Enterokoklar. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi, 2002; 1497–1506.
21. Yıldırım M. Enterokoklar ve Enterokoklarla Gelişen İnfeksiyonlar. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2007; 2: 46-52.
22. Facklam RR, Teixeria LM. Enterococcus. In: Collier L, Bolows A, Sussman. Toplest & Wilson’s Microbiology and microbial infections. Vol 2 (Systematic Bacteriology). 9th edition. London 1998: 669-682.
23. Barrie PS, Christou NV, Patchen Dellinge E. “Patogenicity of The Enterococcus in Surgical I nfections” Annals of Surgery, 1990: 212, 155-159.
24. Chenoweth C, Schaberg D. “The Epidemiology of Enterococcus”. Infect Dis 1990; 9: 80-89.
25. Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. Therapy of Enterococcal Infections. Infect. Dis 1990; 9: 118-126.
26. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. “The Gram Positive Cocci Part Streptococci, Enterococci and The Streptococci Like Bacteria”. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Philadelphia: Lippincott; 1997: 577-629.
27. Bilgehan H: Gram olumlu koklar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı Kitabı. 4. baskı. İzmir, Barış Yayınları, 2004; 496-523.
28. Robert C, Moellering JR. Enterococcus species bovis and Leuconostoc species. Principles and Practise of Infectious Disease 5th edition. Churchill – Livingstone; 2000; 2147-2153.

29. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL. Vancomycin-resistant *E. faecium* bacteriemia: Risk factors for infection. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1120-1126.
30. Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, et al. Vancomycin-resistant enterococcal bacteriemia: Natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 1234-1240.
31. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* 1992; 60 (1): 25-30.
32. Taylor ANS, Bailey E, Rybak MJ. Enterococcus, an emerging pathogen. *Ann. Pharmacother.* 1993; 27: 1231-1241.
33. Sommers MH, Dowell VR: The gram positive cocci. In: Winn W, Allen S, Janda W, Konemann E, Procop P(eds). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* (Sixth Ed.). Philadelphia. W&W Lippincott company 2006; 700-704.
34. Lawrence L, Livornese Jr MD, Susan Dias. Hospital-acquired Infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Transmitted by electronic thermometers. *Annals of Internal Medicine* 1992; 117: 112-121.
35. Çetinkaya Y. Vankomisin dirençli enterokoklar: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora Dergisi* 2000; 1(5): 24-33.
36. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 586-589.
37. Coque TM, Tomayko JF, et al. Vancomycin resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996; 40(11): 2605-2609.

38. Wilke AT, Söyletir Güner, Doğanay M. In: Korten V. İnfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji, eds. Cilt 2 2002:1497-1506.
39. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2010
40. Başustaoğlu A, Aydoğan H. Enterokoklar. Ed: Uzun Ö. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. Bilimsel Tıp Yayınevi. Ankara 2002; 5(2): 45-60.
41. Centers for Disease Control and Prevention Hospital Infection Program. (On-line) <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/nnis> 14 November 2000, date last accessed.
42. Yücesoy M, Yüce A, Yuluğ N. Enterokok Bakteriyemili Dokuz Olgunun Sunumu. İnfeksiyon Dergisi 1996; 10: 339-342.
43. Johson AP. Reviews: The pathogenicity of enterococci. J Antimicrob Chemother 1994; 33: 1083-1089.
44. Krieger JN, Kaiser DL, Wenzel RP. Urinary tract etiology of bloodstream infections in hospitalize patients. J Infect Dis 1983; 148: 57-62.
45. Megron DW. Enterococcal endocarditis. Clin Infect Dis 1992; 15: 63-72.
46. Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus Enterococcus: Taxonomy. *Prokaryotes*. 2006; 4: 163-174.
47. Moellering RC Jr. Infections due to group D streptococci. Infect Dis Rew 1981; 6: 1-7.
48. Linden PK, Pasculle AW, Manez R. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *E. faecium* or vancomycin susceptible *E. faecium*. Clin Infect Dis 1996; 22: 663 -670.

49. Moellering RC Jr. Emergence of enterococcus as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1173-1178.
50. Leblebicioğlu H, Esen S. Hospital-acquired urinary tract infection in Turkey: A nationwide multicenter point prevalence study. *J Hosp Infect* 2003; 53: 207-210.
51. Livornese LL Jr, Drus S, Jamel C. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *E. faecium* transmitted by electronics thermometers. *Ann Intern Med* 1992; 117: 112-216.
52. Coudron PE, Myhall CG, Facklam RR. *Streptococcus faecium* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1044-1048.
53. Kaye D. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Arch Intern Med* 1982; 142: 2006-2009.
54. Taşova Y, İnal S. Enterokok infeksiyonlarında klinik. *Yeni ve Teniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar* 2004; 17-22.
55. Herman DJ, Gerding DN. Antimicrobial resistance among enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1): 1-4.
56. Freitas MCS, Pacheco-Silva A, Barbosa D, Silbert S, Sader H, Sesso R, Camargo LFA. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus fecal* colonization among kidney transplant patients. *BMC Infectious Dis* 2006; 133: 1-7.
57. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 88: 269–290.

58. Aktaş G, Derbentli Ş. Vankomisine dirençli Enterokokların önemi ve epidemiyolojik özellikleri. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal Of Infection)* 2009; 23 (4): 201-209.
59. Çetinkaya Y. Enterokolarda direnç sorunu. *Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar*. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 10-16.
60. Derbentli S. Stafilokok ve enterokokarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri. *Ankem Dergisi* 1996; 10: 211-219.
61. Moellering RC Jr. Enterococcus species, Streptococcus bovis ve Leuconostoc species. Mandell, Douglas, and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition, 2005; 2414-2415.
62. Murray BE. Vancomycinresistant enterococci. *Am J Med* 1997; 101: 284-293.
63. Fontana R, Grossata A, Rossi L, Cheng YR, Satta G. Transition from resistance to hypersusceptibility to s-lactam antibiotics associated with loss of a lower-affinity penicillin-binding protein in a Streptococcus faecium mutant highly resistant to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 678-683.
64. Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000; 13: 686-707.
65. Çolak D. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. Ed: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitapevi, 1999; 85-86.
66. Marothi YA, Agrihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance –An overview. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2005; 23: 214-219.
67. Murray BE. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases* 1998; 4: 37-47.

68. Glew R. Vancomycin. In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, eds. Infectious Diseases. Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1992: 231.
69. Centers for Disease Control and Prevention. Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to Vancomycin-United States, 1997. MMWR 1997; 46: 765.
70. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to Vancomycin. Lancet 1997; 350: 1670.
71. Shlaes DM. Vancomycin-resistant bacteria. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 13: 193.
72. Fekety R. Vancomycin and teicoplanin. In: Mandell GL, Tenet JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York. Churchill Livingstone Inc.; 1995: 3469.
73. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP. 2002 Guidelines for the use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer. Clin Infect Dis 2002; 34: 730-751.
74. Wallace M, Idfield EC III. Prospective evaluation of Red Man Syndrome. J Infect Dis 1994; 169: 700.
75. Farber BF, Moellering RC. Retrospective study of the toxicity of preparations of Vancomycin from 1974 to 1981. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 138.
76. Trutmann M, Wiedeck H, Ruhnke M. Teicoplanin. 10 years of clinical experience. Infection 1994; 22: 430.
77. Öztürk R, Midilli K, Ergin S. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kliniklerinde Yatan Hastaların Klinik Materyallerinde İzole Edilen Stafilokokların Antimikrobik Maddelere Duyarlılıkları. Ankem Dergisi 1995; 9(2): 105.

78. Bibler MR, Fame P, Hagler DN. Clinical evaluation of efficacy, pharmacokinetics, and safety of teicoplanin for serious Gram positive infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 207.
79. French GL. Enterococci and Vancomycin Resistance. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 27: 75-83.
80. Sümerkan B. Vankomisine duyarlı enterokoklar. 2. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Hastane İnfeksiyonları Kongresi (25–28 Nisan 2001, Samsun) Kongre Özet Kitabı'nda. 2001: 187–91.
81. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin resistant enterococci. *Lanset* 1988;1:57-58.
82. Öngen B, Gürler N, Esen F, Karayay S, Töreci K. Glikopeptidlere ve denendiği bütün antibiyotiklere dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *Ankem Derg* 1999; 13: 501-505.
83. Başustaoğlu A, Aydoğan H, Beşirbellioğlu B. GATA'da izole edilen ikinci glikopeptid direnci *E.faecium*. [Özet]. In: Cengiz AT, Erdem B, Dolapçı Gİ, Tekeli FA, eds. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (8-13 Ekim 2000, Antalya) Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti & Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği 2000: 349.
84. Malathum K, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci, drug resistance updates. 1999; 2: 224-243.
85. Başustaoğlu A. Antibiyotiklere direnc mekanizmaları ve çözüm önerileri: Glikopeptidlere direnc. *Hastane İnfeksiyonları*, 2001; 5(3): 202-209.
86. Rice L. B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7: 183-187.

87. Reynolds PE, Courvalin P. Vancomycin Resistance in Enterococci Due to Synthesis of Precursors Terminating in D-Alanyl-D-Serine. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2005; 49: 21–25.
88. Kirkpatrick BD, Harrington SM, Smith D, Marcellus D, Miller C, Dick J, Karanfil L, Perl TM. An outbreak of vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* in a bone marrow transplant unit. *Clinical Infectious Diseases*. 1999; 29: 1268-1273.
89. Tambyah PA, Marx JA, Maki DG. Nosocomial Infection with Vancomycin-dependent Enterococci. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10: 1277-1281.
90. Guidelines For The Prevention And Control Of Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) In Long Term Care Facilities; Maryland Department of Health and Mental Hygiene Epidemiology and Disease Control Program March 1996.
91. Center for disease Control and Prevention. Recommendation for preventing spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 105-113.
92. Alp Ş, Şardan YÇ. Vankomisine dirençli enterokokların epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2008; 39: 89-95.
93. Kim M, Lee S, Lim J, Seo KS, Kim Y, Han K, Choi JH, Yoo JH, Choi SM, Shin WS, Lee DG, Kim KM. Rectal Surveillance Culture of Vancomycin-Resistant Enterococci in Hospitalized Patients at Hematology-Oncology Unit. *Infect Chemother*. 2003; 35: 123-129.
94. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycinresistant enterococci: a randomised controlled trial. *MJA*. 2007; 186: 454-457.
95. Zırakzadeh A, Patel R. Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 529-536.

96. Tacconelli E, Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J AntiMicrob Agent* 2008; 31: 99-106.
97. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 (Suppl): 13-21.
98. Ostrowsky BE, Venkataraman L, D'Agata EMC. Vancomycin-resistant enterococci in intensive care units. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1467-1472.
99. Linden PK, Miller CB. Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33: 113-120.
100. Tornieporth NG, Roberts RB, John J, Hafner A, Riley LW. Risk factors associated with vancomycin-resistant *E. faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 767-772.
101. Çetinkaya Y. Vankomisine dirençli enterokoklara bağlı hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi*; 2004: 171-185.
102. Delisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: A road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*. 2003; 123: 504-518.
103. Boyle JF., Soumakis SA., Rendo A, et al. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1280-1285.
104. Perl TM. The threat of vancomycin resistance. *Am J Med* 1999; 3; 106(5A): 26-37.
105. Pest V, Tallon CS, Sanchez A. Epidemiological, microbiological, clinical and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J Clin Microb* 2000; 19: 742-779.

106. Robert C, Moellering RC. Enterococcus species, Streptococcus bovis and Leuconostoc species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (edc). Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. Sixth edition. Elsevier Churchill Livingstone 2005: 2411-2417.
107. Kutlu SS, Dokuzoğuz B. Enterokok infeksiyonlarında tedavi seçenekleri. Ed: Ünal S, Vahapoğlu H. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004: 23-32.
108. Lefort A, Mainandi JL, Tod M, Lortholory O. Antienterococcal antibiotics. Med Clin North Ame 2000; 6: 1471-1495.
109. Balık İ, Birengel S. Oksazolidinonlar: Ed: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Linezolid-eperezolid. Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2003: 365-374.
110. Şardan YÇ. Enterokoklarla gelişen infeksiyonlar. Ed: Uzun Ö. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi 2002 . Ankara 2002; 5(2): 61-67.
111. Domig JK, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp.2. Pheno- and genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology 2003; 88: 165–188.
112. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2007; 13: 1–46.
113. Vancanneyt M, Lombardi A, Andrighetto C, Knijff E, Torriani S, Björkroth KJ, Franz CMAP, Foulquié MMR, Revets H, De Vuyst L, Swings J, Kersters K, Dellaglio F, Holzapfel WH. Intraspecies GenoMİC Groups in *Enterococcus faecium* and Their

Correlation with Origin and Pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68: 1381-1391.

114. Descheemaeker P, Lammens C, Pot B, Vandamme P, Goossens H. Evaluation of Arbitrarily Primed PCR Analysis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Large Genomic DNA Fragments for Identification of Enterococci Important in Human Medicine. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; 47: 555-561.

115. Saeed B, Hallgren A, Jonasson J, Nilsson LE, Hanberger H, Isaksson B. Modified pulsedfield gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* 2002; 110: 869-874.

116. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kerster K, Swings J, Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J Dairy Res* 2001; 68: 303–316.

117. Tomayko JF, Murray BE. Analysis of *Enterococcus faecalis* Isolates from Intercontinental Sources by Multilocus Enzyme Electrophoresis and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2903-2907.

118. Hsieh SE. Antimicrobial susceptibility and species identification for clinical isolates of enterococci. *J Microbiol Immunol Infect* 2000; 33 :253-257.

119. Hufnagel M, Carey VJ, Baldassarri L, Reinert RR, Huebner J. Distribution of four capsular serotypes of *Enterococcus faecalis* among clinical isolates from different geographical origins and infection sites. *Infection* 2006; 34: 22-25.

120. Fabretti F, Huebner J. Implant infections due to enterococci: role of capsular polysaccharides and biofilm. *Int J Artif Organs* 2005; 28: 1079-1090.

121. Sharpe ME, Shattock F. The Serological Typing of Group D Streptococci associated with Outbreaks of Neonatal Diarrhoea. *J gen Microbio* 1952; 6: 150-165.

122. Savor C, Pfaller MA, Kruszynski JA, Hollis RJ, Noskin GA, Peterson LR. Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assessment using clinical epidemiological data. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3327-3331.
123. Van den Braak N, Van Belkum A, Van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh HA, Endtz HP. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients and poultry products in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1927-1932.
124. Knijff E, Dellaglio F, Lombardi A, Andrighetto C, Torriani S. Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *dll* genes. *J Microbiol Methods* 2001; 47: 35–40.
125. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 24-27.
126. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin FA. PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 273-277.
127. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628–1635.
128. Chiew YF, Hall LMC. Comparison of three methods for the molecular typing of Singapore isolates of enterococci with high-level aminoglycoside resistances. *J Hosp Infect* 1998; 38: 223–230.
129. Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele M, Van Landuyt HW, Gordts B, Butaye P, Swings J, Haesebrouck F. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 821– 827.

130. Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, Willems RJL. Molecular Characterization of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Hospitalized Patients in Norway. *Journal Of Clinical Microbiology* 2003; 41: 2330-2336.
131. D'Agata EMC, Gerrits MM, Tang YW, Samore M, Kusters JG. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 550-554.
132. Bedendo J, Pignatari AC. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. *Braz. J Med Biol Res* 2000; 33: 1269-1274.
133. Park Y-J, Oh EJ, Kim BK, Kim SM, Shim SI. Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E. faecium* polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 269-273.
134. Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 415-418.
135. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, Van Embden JDA, Willems RJL. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1963-1971.
136. Gültekin M, Günseren F. Vankomisin dirençli enterokoklar. *Hastane infeksiyonları Dergisi* 2000; 4: 195-204.
137. Vural T, Şekercioğlu AS, Ögünç D. Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu. *Ankem Derg* 1999; 13: 1-4.

138. Tenover FC, Tokars J, Swenson J. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1695-1699.
139. Yamane N, Miyagama S, Nokasone I. "Laboratory evaluation of antimicrobial susceptibility testing to detect VRE. *J Clin Pathol Jpn* 1997; 45: 381-390.
140. Dona Benadof A, Marcela San Martı́n B, Judith Aguirre. A new multiplex PCR assay for the simultaneous detection of Vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs. *Journal of Infection* 2010; 60: 354-359.
141. Şekercioğlu AO, Vural T, Çolak D, Öđünç D, Öngüt G. "Kan kültürlerinde izole edilen enterokok türlerinin antibiyotik duyarlılık ve yüksek düzey gentamisin dirençliliklerinin saptanması. *Ankem Derg* 1998; 12: 2114.
142. Sümerkan B. Vankomisine dirençli enterokoklar. In:Günaydın M, Esen Ş, Saniç A, Lelebiciođlu H, eds. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları Samsun:Samsun İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Araştırmaları Derneği* 2002: 329-334.
143. Rudy M, Zientara M, Bek T. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. *Pol J Microbiol* 2005; 54: 77-80.
144. Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP) Surveillance for Vancomycin Resistant Enterococci (VRE) in Patients Hospitalized in Canadian Acute-Care Hospitals Participating in CNISP 2006 Results.
145. Schouten MA, Hoogkamp JAA, Korstanje JFG. Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 816-822.
146. Zer Y, Bayram A, Akın FÖ, Balcı İ. Analysis of the molecular epidemiology and antibiotic sensitivity of vancomycin-resistant enterococci. *Gaziantep Med J* 2011; 17(2): 82-86.

147. Landman D, Quale JM, Oydna E, Willey B. Comparison of selective media for identifying fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 751-752.
148. Ceryan N, Ülkar GB, Gürbüz OA, Apaydın N, Oskovi H, Mert A. Enterokoklarda glikopeptid direnci [Özet]. In: Cengiz AT, Erdem B, Dolapçı Gİ, Tekeli FA, eds. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (8-13 Ekim 2000, Antalya) Program ve Özet Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti & Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği 2000: 380.
149. Harris AD, Nemoy L, Johnson JA. Co-carriage rates of vancomycin-resistant *Enterococcus* and extended-spectrum betalactamase- producing bacteria among a cohort of intensive care unit patient:implication for an active surveillance program. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004; 25: 105-108.
150. Grayson ML, Grabsch AE, Johnson PDR. Outcome of a screening program for vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Victoria. *MJA* 1999; 171: 133-136.
151. Gordts B, Landuyt HV, Ieven M. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the Intestinal tract of hospitalized patient. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2842-2846.2.
152. Zaas AK, Song X, Tucker P, Perl TM. Risk factors for development of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in patients with cancer who are colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1139-1146.
153. Padiglione AA, Wolfe R, Grabsch EA. Risk factors for new detection of vancomycin-resistant enterococci in acute-care hospitals that employ strict infection control procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (8): 2492-2498.
154. Scagnelli M, Pellizer G, de Lalla F. Epidemiological analysis of vancomycin-resistant enterococci in a large tertiary-care hospital in Northern Italy. *Eur J Clin Microbiol* 2001; 20: 609-616.

155. Dan M, Poch F, Leibson L. Rectal colonization with vancomycin-resistant enterococci among high-risk patients in an Israeli hospital. *J Hosp Infect* 1999; 43 (3): 231-238.
156. Elizaga ML, Weinstein RA, Hayden MK. Patients in long-term care facilities: a reservoir for vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (4): 441-446.
157. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ. The hospital epidemic of vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors and control. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22: 140-147.
158. Warren DK, Kollef MH, Seiler SM. The epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in the medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 257-263.
159. Garya Noskin, Valentina S, Isabell C. Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci on Fingertips and Environmental Surfaces; *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1995: Vol 16(10); 577-581.
160. Rademaker JLW, Savelkoul P. PCR amplification-based microbial typing. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ (eds). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington DC: ASM Press, 2004: 197-221.
161. Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C., Martinez-Beltran J. PCR based DNA fingerprinting (REP-PCR, AP-PCR) and pulsed-field gel electrophoresis characterization of a nosocomial outbreak caused by imipenem and meropenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 635-643.
162. Silbert S, Pfaller MA, Hollis RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004; 25: 847-851 abs.

163. Gültekin A. Sistemik Kandidaz Şüpheli Hasta Örneklerinden *Candida* türlerinin izolasyonu, Tanımlanması ve Genotiplendirilmesi. 2009, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.

164. Javad A, Seifert H, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: comparison of outbreak and sporadic isolates. J Clin Microbiol 1998; 1938-1941.

165. Aygün G. Yoğun bakım birimi infeksiyonlarında çevre şartlarının önemi. Klinik Dergisi 2003; 16(3): 106-107.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Osmaniye'nin Toprakkale ilçesinde doğdu. 1992-2003 yılları arasında ilkokul, ortaokul ve lise eğitimimi tamamladı. 2003-2007 yılları arasında Gazi Üniversitesi Çorum Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü'nde okudu. 2007 yılından itibaren hemşirelik mesleğini yapmakta olup halen Şırnak-Silopi Devlet Hastanesi Ameliyathane Birimi'nde Ameliyathane Hemşire olarak görev yapmakta. 2009 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladı.

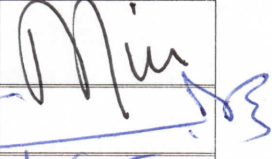



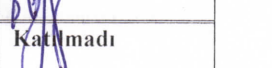
T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	ARAŞTIRMA ADI	Hemodiyaliz Ara yoğun Bakım Ünitesi ve Nefroloji Servisi Hastalarından İzole Edilen Vankomisin Rezistans Enterekok Suşlarının Direnç Genlerinin Saptanması ve Klonal Kökenlerinin Araştırılması.
	SORUMLU ARAŞTIRICI UNVAN/ADI-SOYADI	Prof.Dr. İclal BALCI G.Ü.Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D
	YARDIMCI ARAŞTIRICI UNVANI/ADI-SOYADI	Hemşire Ülkü DABAN G.Ü.Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D Yrd.Doç.Dr.Yasemin ZER G.Ü.Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji A.D
	KOORDİNATÖR MERKEZ	
DESTEKLEYİCİ		

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Değişiklik No/Tarihi	Dili
	PROTOKOL	-	-
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ	-	-
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU	-	-
	OLGU RAPOR FORMU	-	-

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 12/2010-11 Tarih: 16.12.2010
	Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılması planlanan ve yukarıda adı geçen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgelerin araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak 16.12.2010 tarihli Etik Kurul toplantısında incelenmesi sonucunda, adı geçen araştırmanın yapılmasının uygunluğuna toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı-Soyadı/ Etik Kurul Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç.Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ Başkan	Farmakoloji	G.Ü.Tıp Fak. Farmakoloji A.D.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Vedat DAVUTOĞLU	Kardiyoloji	G.Ü.Tıp Fak. Kardiyoloji A.D	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Serdar ÜŞÜMEZ Raportör/Üye	Diş Hekimi	G.Ü. Diş Hek. Fak.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Ercan SİVASLI Üye	Pediyatri	G.Ü.Tıp Fak. Pediyatri A.D.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd.Doç.Dr.Beyhan CENGİZ Üye	Fizyoloji	G.Ü.Tıp Fak. Fizyoloji A.D.	E	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd.Doç.Dr.Ş.Nur AKSOY Üye	Biyokimya	G.Ü.Tıp Fak. Biyokimya A.D.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı
Ecz.Ahmet BOŞNAK Üye	Eczacı	G.Ü. Tıp Fak. Farmakoloji A.D.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Katılmadı

* Araştırma ile ilişki
** Toplantıda Bulunma